

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
22. Februar 2001 (22.02.2001)

PCT

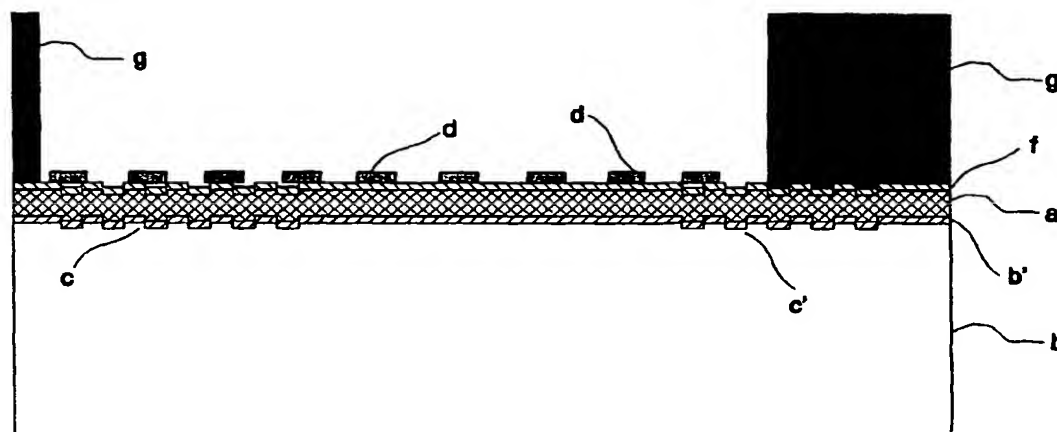
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 01/13096 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: G01N 21/77, 21/76, 21/64, 21/55, 33/543
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/07529
- (22) Internationales Anmeldedatum: 3. August 2000 (03.08.2000)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 1486/99 13. August 1999 (13.08.1999) CH
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): ZEPTOSENS AG [CH/CH]; Benkenstrasse 254, CH-4108 Witterswil (CH).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ABEL, Andreas, P. [CH/CH]; Rothbergstrasse 16a, CH-4054 Basel (CH). DUBENECK, Gert, L. [DE/DE]; Ezmattenweg 34, D-79189 Bad Krozingen (DE). EHRAT, Markus [CH/CH]; Im Brütel 6, CH-4312 Magden (CH). KRESBACH, Gerhard, M. [DE/DE]; Burghaldenweg 6, D-79219 Staufen (DE). PAWLAK, Michael [DE/DE]; Andelsbachstrasse 5, D-79725 Laufenburg (DE). SCHÜRMANN-MADER, Eveline [CH/CH]; Talhübel 1, CH-5089 Zeihen (CH).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: DEVICE AND METHOD FOR DETERMINING MULTIPLE ANALYTES

(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG UND VERFAHREN ZUR MULTIANALYTBESTIMMUNG



(57) Abstract: The invention relates to a device comprising a planar optical wave-guide which forms part of a sensor platform and a layer (g) which is in contact with said sensor platform directly or through an intermediate sealing medium and which is sealed directly or with the sealing medium. Said layer has a plurality of recesses which are open at least at the side of the sensor platform and which form a plurality of sample containers in a two-dimensional arrangement. The invention is characterized in that different biochemical or biological identifying elements for specifically identifying and bonding different analytes are immobilized in five or more discrete measuring areas (d) in a single sample container respectively. Said measuring areas interact optically with the excitation light from the optical wave-guide, which forms parts of a sensor platform. Said sensor platform forms a delimiting surface of the sample containers. Sample or reagent liquids that have been supplied to said sample containers can be removed therefrom and other sample or reagent liquids can then be supplied to the same sample containers, optionally without washing.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,  
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

- (84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

- Mit internationalem Recherchenbericht.
- Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist: Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) **Zusammenfassung:** Gegenstand der Erfindung ist eine Vorrichtung, umfassend einen planaren optischen Wellenleiter als Bestandteil einer Sensorplattform und eine mit der Sensorplattform direkt oder über ein dichtendes Medium vermittelt in Kontakt stehende, direkt dicht verschliessende oder über das dichtende Medium dicht verschlossene Schicht (g) mit einer Vielzahl von mindestens zur Seite der Sensorplattform offenen Aussparungen, welche eine Vielzahl von Probenbehältnissen in einer zweidimensionalen Anordnung bilden, dadurch gekennzeichnet, dass in jeweils fünf oder mehr diskreten Messbereichen (d) in einem einzelnen Probenbehältnis unterschiedliche biochemische oder biologische Erkennungselemente zur spezifischen Erkennung und Bindung unterschiedlicher Analyten immobilisiert sind, wobei die besagten Messbereiche in optischer Wechselwirkung mit dem Anregungslicht aus dem optischen Wellenleiter, als Bestandteil einer Sensorplattform, stehen, welche eine Begrenzungsfläche dieser Probenbehältnisse bildet, wobei den Probenbehältnissen zugeführte Proben- oder Reagensflüssigkeiten abgeführt und nachfolgend weitere Proben- oder Reagensflüssigkeiten, gegebenenfalls ohne Waschschritte, den gleichen besagten Probenbehältnissen zugeführt werden können.

## **Vorrichtung und Verfahren zur Multianalytbestimmung**

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung, umfassend eine Vielzahl von Probenbehältnissen, in denen in jeweils fünf oder mehr diskreten Messbereichen unterschiedliche biochemische oder biologische Erkennungselemente zur spezifischen Erkennung und Bindung unterschiedlicher Analyten immobilisiert sind, wobei die biologischen oder biochemischen Erkennungselemente in diesen Messbereichen entweder direkt oder über eine Haftvermittlungsschicht und gegebenenfalls noch weitere Schichten auf der Oberfläche eines optischen Wellenleiters als Bestandteil einer Sensorplattform immobilisiert sind, welche eine Begrenzungsfläche dieser Probenbehältnisse bildet. Dabei kann die Sensorplattform in verschiedenen Ausführungsformen vorliegen. Die Erfindung betrifft auch ein analytisches System, welches eine erfindungsgemäße Vorrichtung mit verschiedenen Ausführungsformen der Sensorplattform, ein optisches System zur Lumineszenzbestimmung mit mindestens einer Anregungslichtquelle und mindestens einem Detektor zur Erfassung des von den Messbereichen ausgehenden Lichts sowie Zuführungsmittel, um eine oder mehrere Proben mit den Messbereichen auf der Sensorplattform in Kontakt zu bringen, umfasst. Weiterer Gegenstand der Erfindung sind Lumineszenznachweisverfahren mit erfindungsgemäßen Sensorplattformen, optischen Systemen und analytischen Systemen sowie die Verwendung dieser Verfahren für die quantitative Affinitätssensorik sowie für verschiedene weitere Anwendungen.

Ziel der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung von Messanordnungen mit einer Vielzahl von kleinvolumigen Probenbehältnissen, in denen eine Vielzahl von Analyten durch ein hochempfindliches Nachweisverfahren gleichzeitig bestimmt werden kann.

## 2

Zur Bestimmung einer Vielzahl von Analyten sind gegenwärtig vor allem Verfahren verbreitet, in denen in sogenannten Mikrotiterplatten der Nachweis unterschiedlicher Analyten in diskreten Probenbehältnissen oder "Wells" dieser Platten erfolgt. Am weitesten verbreitet sind dabei Platten mit einem Raster von 8 x 12 Wells auf einer Grundfläche von typischerweise ca. 8 cm x 12 cm, wobei zur Füllung eines einzelnen Wells ein Volumen von einigen hundert Mikrolitern erforderlich ist. Für zahlreiche Anwendungen wäre es jedoch wünschenswert, mehrere Analyten in einem einzigen Probenbehältnis, unter Einsatz eines möglichst kleinen Probenvolumens zu bestimmen.

In der US-P 5,747,274 werden Messanordnungen und Verfahren zur Früherkennung eines Herzinfarkts, durch die Bestimmung mehrerer von mindestens drei Herzinfarktmarkern beschrieben, wobei die Bestimmung dieser Marker in individuellen oder in einem gemeinsamen Probenbehältnis erfolgen kann, wobei im letzteren Falle, der gegebenen Beschreibung folgend, ein einziges Probenbehältnis als ein durchgehender Flusskanal ausgebildet ist, dessen eine Begrenzungsfläche beispielsweise eine Membran bildet, auf der Antikörper für die drei verschiedenen Marker immobilisiert sind. Es gibt jedoch keine Hinweise auf eine Bereitstellung von mehreren derartigen Probenbehältnissen oder Flusskanälen auf einem gemeinsamen Träger. Ausserdem werden keine geometrischen Angaben über die Grössen der Messflächen gegeben.

In den WO 84/01031, US-P 5,807,755, US-P 5,837,551 und US-P 5,432,099 wird die Immobilisierung für den Analyten spezifischer Erkennungselemente in Form kleiner "Spots" mit teilweise deutlich unter 1 mm<sup>2</sup> Fläche auf festen Trägern vorgeschlagen, um durch Bindung eines nur kleinen Teils vorhandener Analytmoleküle eine nur von der Inkubationszeit abhängige, aber – in Abwesenheit eines kontinuierlichen Flusses - vom absoluten Probenvolumen im wesentlichen unabhängige Konzentrationsbestimmung des Analyten vornehmen zu können. Die in den zugehörigen Ausführungsbeispielen beschriebenen Messanordnungen beruhen auf Fluoreszenznachweisen in konventionellen Mikrotiterplatten. Dabei werden auch Anordnungen beschrieben, in denen Spots von bis zu drei unterschiedlichen fluoreszenzmarkierten Antikörpern in einem gemeinsamen Mikrotiterplattenwell ausgemessen werden. Den in diesen Patentschriften dargelegten theoretischen Überlegungen folgend, wäre eine Minimierung der Spotgrösse wünschenswert. Limitierend wirke jedoch die

minimale Signalthöhe, die vom Untergrundsignal unterschieden werden könne.

Zur Erreichung tieferer Nachweisgrenzen sind in den vergangenen Jahren zahlreiche Messanordnungen entwickelt worden, in denen der Nachweis des Analyten auf dessen Wechselwirkung mit dem evaneszenten Feld beruht, welches mit der Lichtleitung in einem optischen Wellenleiter verbunden ist, wobei auf der Oberfläche des Wellenleiters biochemische oder biologische Erkennungselemente zur spezifischen Erkennung und Bindung der Analytmoleküle immobilisiert sind.

Koppelt man eine Lichtwelle in einen optischen Wellenleiter ein, der von optisch dünneren Medien, d.h. Medien mit niedrigerem Brechungsindex umgeben ist, so wird sie durch Totalreflektion an den Grenzflächen der wellenleitenden Schicht geführt. In die optisch dünneren Medien tritt dabei ein Bruchteil der elektromagnetischen Energie ein. Diesen Anteil bezeichnet man als evaneszentes oder quergedämpftes Feld. Die Stärke des evaneszenten Feldes ist sehr stark abhängig von der Dicke der wellenleitenden Schicht selbst sowie vom Verhältnis der Brechungsindices der wellenleitenden Schicht und der sie umgebenden Medien. Bei dünnen Wellenleitern, d. h. Schichtdicken von derselben oder niedrigerer Dicke als der zu führenden Wellenlänge, können diskrete Moden des geleiteten Lichts unterschieden werden. Derartige Verfahren haben den Vorteil, dass die Wechselwirkung mit dem Analyten auf die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes ins angrenzende Medium, in der Größenordnung von einigen hundert Nanometern, beschränkt ist und Störsignale aus der Tiefe des Mediums weitgehend vermieden werden können. Die ersten vorgeschlagenen derartigen Messanordnungen beruhten auf hochmultimodalen, selbsttragenden Einschichtwellenleitern, wie beispielsweise Fasern oder Plättchen aus transparentem Kunststoff oder Glas, mit Stärken von einigen hundert Mikrometern bis zu mehreren Millimetern.

In der US-P 4,978,503 wird eine Messanordnung beschrieben, in der eine flüssige Probe über Kapillarkräfte in eine Kavität eingezogen wird, wobei eine optisch transparente Seitenwand als selbsttragender Multimode-Wellenleiter ausgebildet ist, wobei zumindest auf einem Teil seiner der Kavität zugewandten Oberfläche ("Patch") ein biochemisches Erkennungselement zur Erkennung und Bindung eines Analyten aus einer

Probe immobilisiert ist. Zwar wird in der obigen Patentschrift die Herstellung von Arrays solcher Anordnungen mit mehreren diskreten Patches beschrieben, jedoch geht aus den weiteren Erläuterungen hervor, dass die Patches seitlich jeweils durch Verbindungsstege, vorgesehen zur Verbindung der Boden- und der Deckelplatten der Kapillaren, voneinander abgegrenzt sind, so dass nach Vereinzelung der Arrays jede Kapillare nur einen Patch immobilisierter Erkennungselemente enthält. Weiterhin ist in dieser Anordnung von Nachteil, dass ein Austausch der in die Kapillare gelangten Flüssigkeit nicht vorgesehen ist, welches beispielsweise in einem mehrstufigen Assay wünschenswert wäre.

In der WO 94/27137 werden Messanordnungen beschrieben, in denen "Patches" mit unterschiedlichen Erkennungselementen, zum Nachweis unterschiedlicher Analyten, auf einem selbsttragenden optischen Substratwellenleiter (Einschichtwellenleiter) mit Stirnflächenlichteinkopplung immobilisiert sind, wobei die räumlich selektive Immobilisierung mittels photoaktivierbarer Crosslinker erfolgt. Gemäss der gegebenen Beschreibung können mehrere Patches in Reihe in gemeinsamen parallelen Flusskanälen oder Probenbehältnissen angeordnet sein, wobei sich die parallelen Flusskanäle oder Probenbehältnisse über die gesamte Länge des als Sensor genutzten Bereichs des Wellenleiters erstrecken, um eine Beeinträchtigung der Lichtleitung im Wellenleiter zu vermeiden. Hinweise auf eine zweidimensionale Integration einer Vielzahl von Patches in Probenbehältnissen relativ kleiner Ausmasse, d.h. von deutlich weniger als  $1\text{cm}^2$  Grundfläche, werden jedoch nicht gegeben. In einer ähnlichen Anordnung werden in der WO 97/35203 verschiedene Ausführungsformen einer Anordnung beschrieben, in der in parallelen, separaten Flusskanälen oder Probenbehältnissen für die Probe und Kalibrationslösungen niedriger und gegebenenfalls zusätzlich hoher Analytkonzentration unterschiedliche Erkennungselemente zur Bestimmung verschiedener Analyten jeweils immobilisiert sind. Auch hier wird jedoch keinerlei Hinweis gegeben, wie eine hohe Integrationsdichte unterschiedlicher Erkennungselemente in einer zu einem gemeinsamen Behältnis zugeführten Probe erreicht werden könnte. Ausserdem ist die Empfindlichkeit hoch multimodaler, selbsttragender Einschichtwellenleiter für eine Vielzahl von Anwendungen, in denen die Erreichung sehr tiefer Nachweisgrenzen erforderlich ist, nicht ausreichend.

## 5

Zur Verbesserung der Empfindlichkeit und gleichzeitig einfacheren Herstellung in Massenfabrication wurden planare Dünnschichtwellenleiter vorgeschlagen. Ein planarer Dünnschichtwellenleiter besteht im einfachsten Fall aus einem Dreischichtsystem: Trägermaterial, wellenleitende Schicht, Superstrat ( bzw. zu untersuchende Probe), wobei die wellenleitende Schicht den höchsten Brechungsindex besitzt. Zusätzliche Zwischenschichten können die Wirkung des planaren Wellenleiters noch verbessern.

Es sind verschiedene Verfahren für die Einkopplung von Anregungslicht in einen planaren Wellenleiter bekannt. Die am frühesten benutzten Verfahren beruhten auf Stirnflächenkopplung oder Prismenkopplung, wobei zur Verminderung von Reflexionen infolge von Luftspalten im allgemeinen eine Flüssigkeit zwischen Prisma und Wellenleiter aufgebracht wird. Diese beiden Methoden sind vor allem in Verbindung mit Wellenleitern relativ grosser Schichtdicke, d. h. insbesondere selbsttragenden Wellenleitern, sowie bei einem Brechungsindex des Wellenleiters von deutlich unter 2 geeignet. Zur Einkopplung von Anregungslicht in sehr dünne, hochbrechende wellenleitende Schichten ist demgegenüber die Verwendung von Koppelgittern eine wesentlich elegantere Methode.

Es können verschiedene Methoden zum Analytnachweis im evaneszenten Feld geführter Lichtwellen in optischen Schichtwellenleitern unterschieden werden. Aufgrund des eingesetzten Messprinzips kann man beispielsweise zwischen Fluoreszenz- oder allgemeiner Lumineszenzmethoden auf der einen Seite und refraktiven Methoden andererseits unterscheiden. Hierbei können Verfahren zur Erzeugung einer Oberflächenplasmonenresonanz in einer dünnen Metallschicht auf einer dielektrischen Schicht mit niedrigerem Brechungsindex in die Gruppe der refraktiven Methoden mit einbezogen werden, sofern als Basis zur Bestimmung der Messgrösse der Resonanzwinkel des eingestrahnten Anregungslichts zur Erzeugung der Oberflächenplasmonenresonanz dient. Die Oberflächenplasmonenresonanz kann aber auch zur Verstärkung einer Lumineszenz oder zur Verbesserung des Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisses in einer Lumineszenzmessung verwendet werden. Die Bedingungen zur Erzeugung einer Oberflächenplasmonenresonanz sowie zur Kombination mit Lumineszenzmessungen sowie mit wellenleitenden Strukturen sind vielfach in der Literatur beschrieben, beispielsweise in den US-Patenten US-P 5,478,755, US-P 5,841,143, US-P 5,006,716 und US-P 4,649,280.

## 6

Mit dem Begriff "Lumineszenz" wird in dieser Anmeldung die spontane Emission von Photonen im ultravioletten bis infraroten Bereich nach optischer oder nichtoptischer, wie beispielsweise elektrischer oder chemischer oder biochemischer oder thermischer Anregung, bezeichnet. Beispielsweise sind Chemilumineszenz, Biolumineszenz, Elektrolumineszenz und insbesondere Fluoreszenz und Phosphoreszenz unter dem Begriff "Lumineszenz" mit eingeschlossen.

Bei den refraktiven Messmethoden wird die Änderung des sogenannten effektiven Brechungsindex aufgrund molekularer Adsorption oder Desorption auf dem Wellenleiter zum Nachweis des Analyten benutzt. Diese Änderung des effektiven Brechungsindex wird, im Falle von Gitterkoppler-Sensoren, bestimmt aus der Änderung des Koppelwinkels für die Ein- oder Auskopplung von Licht in oder aus dem Gitterkoppler-Sensor, und im Falle von interferometrischen Sensoren aus der Änderung der Phasendifferenz zwischen dem in einem Sensorarm und einem Referenzarm des Interferometers geführten Messlichts.

Der Stand der Technik zum Einsatz von einem oder mehreren Koppelgittern zum Ein- und/oder Auskoppeln geführter Wellen mittels eines oder mehrerer Koppelgitter ist beispielsweise in K. Tiefenthaler, W. Lukosz, "Sensitivity of grating couplers as integrated-optical chemical sensors", J. Opt. Soc. Am. B6, 209 (1989); W. Lukosz, Ph.M. Nellen, Ch. Stamm, P. Weiss, "Output Grating Couplers on Planar Waveguides as Integrated, Optical Chemical Sensors", Sensors and Actuators B1, 585 (1990), und in T. Tamir, S.T. Peng, „Analysis and Design of Grating Couplers“, Appl. Phys. 14, 235-254 (1977), beschrieben.

In der US-P 5,738,825 wird eine Anordnung bestehend aus einer Mikrotiterplatte mit vollständig durchgehenden Bohrungen und einem Dünnschichtwellenleiter als Bodenplatte, letzterer bestehend aus einem dünnen wellenleitenden Film auf einem transparenten, selbsttragenden Substrat, beschrieben. In Kontakt mit den aus der durchbohrten Mikrotiterplatte und dem Dünnschichtwellenleiter als Bodenplatte gebildeten, offenen Probenbehältnissen sind jeweils Beugungsgitter für die Ein- und Auskopplung von Anregungslicht vorgesehen, um aus Änderungen des beobachteten Koppelwinkels die dafür verantwortlichen Änderungen



## 7

des effektiven Brechungsindex infolge von Adsorption oder Desorption von nachzuweisenden Analytmolekülen zu bestimmen. Ein Nachweis mehrerer Analyten in einem Probenbehältnis, durch Bindung an verschiedene auf der Gitterstruktur in dem Probenbehältnis immobilisierte Erkennungselemente, ist jedoch nicht vorgesehen und erscheint aufgrund des refraktiven Messprinzips, d. h. der Bestimmung von relativen Änderungen des Koppelwinkels, auch schwer realisierbar.

Die genannten refraktiven Methoden haben den Vorteil, dass sie ohne Verwendung zusätzlicher Markierungsmoleküle, sogenannter molekularer Labels, eingesetzt werden können. Der Nachteil dieser labelfreien Methoden ist jedoch, dass die damit erzielbaren Nachweisgrenzen aufgrund der geringen Selektivität des Messprinzips, in Abhängigkeit von dem Molekulargewicht des Analyten auf pico- bis nanomolare Konzentrationsbereiche beschränkt sind, was für viele Anwendungen der modernen Spurenanalytik, beispielsweise für diagnostische Applikationen, nicht ausreichend ist.

Zur Erreichung tieferer Nachweisgrenzen erscheinen lumineszenzbasierende Methoden aufgrund grösserer Selektivität der Signalerzeugung besser geeignet. Dabei ist die Lumineszenzanregung auf die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes in das optisch dünnere Medium, also auf die unmittelbare Umgebung des wellenleitenden Bereichs mit einer Eindringtiefe in der Grössenordnung von einigen hundert Nanometern ins Medium beschränkt. Dieses Prinzip wird evaneszente Lumineszenzanregung genannt.

Mittels hochbrechender Dünnschichtwellenleiter, in Kombination mit Lumineszenzdetektion, basierend auf einem nur einige hundert Nanometer dünnen wellenleitenden Film auf einem transparenten Trägermaterial, konnte in den letzten Jahren die Empfindlichkeit deutlich gesteigert werden. Beispielsweise wird in der WO 95/33197 eine Methode beschrieben, in der das Anregungslicht über ein Reliefgitter als diffraktives optisches Element in den wellenleitenden Film eingekoppelt wird. Die Oberfläche der Sensorplattform wird mit einer den Analyten enthaltenden Probe in Kontakt gebracht, und die isotrop angestrahlte Lumineszenz in der Eindringtiefe des evaneszenten Feldes befindlicher lumineszenzfähiger Substanzen wird mittels geeigneter Messvorrichtungen, wie zum Beispiel Photodioden,

## 8

Photomultiplier oder CCD-Kameras, gemessen. Es ist auch möglich, den in den Wellenleiter rückgekoppelten Anteil der evaneszent angeregten Strahlung über ein diffraktives optisches Element, zum Beispiel ein Gitter, auszukoppeln und zu messen. Diese Methode ist zum Beispiel in der WO 95/33198 beschrieben.

Ein Nachteil aller oben im Stand der Technik, insbesondere in der WO 95/33197 und der WO 95/33198, beschriebenen Verfahren zur Detektion evaneszent angeregter Lumineszenz mit Dünnschichtwellenleitern liegt jedoch darin, dass auf der als homogener Film ausgebildeten Sensorplattform jeweils nur eine Probe analysiert werden kann. Um weitere Messungen auf derselben Sensorplattform durchführen zu können, sind jedesmal aufwendige Wasch- bzw. Reinigungsschritte notwendig. Dies gilt insbesondere, wenn ein von der ersten Messung verschiedener Analyt detektiert werden soll. Im Falle eines Immunoassays bedeutet dies im allgemeinen, dass die gesamte immobilisierte Schicht auf der Sensorplattform ausgetauscht oder gleich eine neue Sensorplattform als ganzes verwendet werden muss.

Zur gleichzeitigen oder aufeinanderfolgenden Durchführung von ausschliesslich lumineszenzbasierenden Mehrfachmessungen mit im wesentlichen monomodalen, planaren anorganischen Wellenleitern sind, z. B. in der WO 96/35940, Vorrichtungen (Arrays) bekannt geworden, in denen auf einer Sensorplattform wenigstens zwei getrennte wellenleitende Bereiche angeordnet sind, die getrennt mit Anregungslicht beaufschlagt werden. Die Aufteilung der Sensorplattform in getrennte wellenleitende Bereiche hat allerdings nachteilig zur Folge, dass der Platzbedarf für diskrete Messbereiche, in diskreten wellenleitenden Bereichen auf der gemeinsamen Sensorplattform relativ gross ist und daher nur eine verhältnismässige geringe Dichte unterschiedlicher Messbereiche (oder sogenannter "features") erreicht werden kann.

Im Sinne der vorliegenden Erfindung sollen räumlich getrennte Messbereiche (d) (gemäss Abbildung 1) durch die geschlossene Fläche definiert werden, die dort immobilisierte biologische oder biochemische oder synthetische Erkennungselementen zur Erkennung eines Analyten aus einer flüssigen Probe einnehmen. Diese Flächen können dabei eine beliebige Geometrie, beispielsweise die Form von Punkten, Kreisen, Rechtecken, Dreiecken, Ellipsen oder Linien, haben.

In der WO 98/22799 werden neben einer Vielzahl weiterer Vorrichtungen für die Ausgestaltung von Probenbehältnissen für Messanordnungen zur Bestimmung der im evaneszenten Feld eines planaren Wellenleiters angeregten Lumineszenz auch solche Vorrichtungen vorgeschlagen, welche der Form bekannter Mikrotiterplatten entsprechen. Die Bestimmung mehrerer Analyten durch Bindung an verschiedene innerhalb eines einzelnen Probenbehältnisse immobilisierte Erkennungselemente ist jedoch auch hier nicht vorgesehen.

Es besteht daher ein Bedürfnis für die Bereitstellung von kleinvolumigen Probenbehältnissen in Kombination mit geeigneten Sensorplattformen, in denen eine Vielzahl von Analyten durch ein hochempfindliches Nachweisverfahren gleichzeitig ohne grossen Aufwand bestimmt werden kann.

Es wurde nun überraschend gefunden, dass durch die gewählte Kombination der hocheffizienten Fluoreszenzanregung im evaneszenten Feld eines geeigneten optischen Wellenleiters, insbesondere von Dünnschichtwellenleitern, und Anordnung von mehreren Messbereichen mit unterschiedlichen biologischen oder biochemischen Erkennungselementen in einem einzigen Probenbehältnis, als Teil eines zweidimensionalen Arrays von Probenbehältnissen auf einer gemeinsamen Sensorplattform, wesentlich tiefere Nachweisgrenzen und höhere Integrationsdichten von Messbereichen erzielt werden können als mit den bekannten konventionellen Vorrichtungen und Verfahren (z. B. ELISA-Tests auf klassischen Mikrotiterplatten). Dabei kann im jeweiligen Nachweisschritt des Verfahrens, unter Zugabe von lumineszenzmarkierten Bindungspartnern des jeweiligen Bioaffinitätsassays, der Lumineszenznachweis ohne zusätzlichen Waschschrift durchgeführt werden, was eine Vereinfachung des Verfahrens bedeutet.

Überraschend kann durch die Anordnung mehrerer Messbereiche und unterschiedlicher biologischer oder biochemischer Erkennungselemente in einem einzigen Probenbehältnis, unter Zugabe einer einzelnen Probe, in einer Einzelmessung bereits statistisch relevante Information, beispielsweise zur Assayreproduzierbarkeit, generiert werden. Zugleich zeigen die dabei

erzeugten Daten sogar eine geringere Variabilität als die Ergebnisse einer entsprechenden Anzahl von Einzelmessungen in diskreten Probenbehältnissen, da mit der Simultanmessung eine Vielzahl möglicher zusätzlicher Variabilitäts- und Fehlerquellen für die voneinander unabhängigen Einzelmessungen ausgeschlossen werden. Damit kann eine bedeutende Einsparung an Analysenzeit und einzusetzender Proben- und Reagentienmenge im Vergleich zu den vorher beschriebenen und bekannten Nachweisverfahren (z. B. ELISA-Tests) erzielt werden. Insbesondere ist es auch möglich, Referenzierungsmessungen, insbesondere zur Bestimmung chemischer Parameter wie z.B. unspezifische Bindung, Crossreaktivitäten, Bestimmung von pH oder  $pO_2$  der Probenlösung etc., in jedem einzelnen Probenbehältnis durchzuführen, indem einer oder mehrere der Messbereiche in einem Probenbehältnis für derartige Referenzierungsmessungen verwendet werden. Damit kann einerseits die Zuverlässigkeit dieser Referenzierungsmessungen deutlich erhöht werden gegenüber den herkömmlichen Verfahren, in denen diese Messungen in jeweils verschiedenen Probenbehältnissen vorgenommen wurden.

Weiterhin kann mit der Vorrichtung und dem damit durchgeführten Nachweisverfahren die Anzahl der Messungen pro Platte und damit der Durchsatz auf ein Vielfaches erhöht werden. Damit können die Reproduzierbarkeit der Messungen und Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit verschiedenen Proben deutlich verbessert werden, u. a. weil die üblichen starken Platte-zu-Platte Schwankungen wegfallen. Mit beispielsweise 96 Probenbehältnissen, in denen sich jeweils 400 Messbereiche befinden, auf einer einzigen Sensorplattform ist es möglich, umfangreiche Messreihen, beispielsweise für die pharmazeutische Produktentwicklung, auf einer einzigen erfindungsgemässen Vorrichtung durchzuführen, wofür typischerweise 400 Mikrotiterplatten benötigt wurden. Neben der deutlichen Verringerung von Proben- und Reagentienmaterial und einem damit vermindertem Aufwand für die Probenvorbereitung wird zugleich die Zuverlässigkeit und Genauigkeit der Ergebnisse aus den genannten Gründen deutlich erhöht.

Die erfindungsgemässe Vorrichtung und das erfindungsgemässe Verfahren bieten damit Möglichkeiten, die mit den herkömmlichen, bekannten Analysesystemen und -verfahren nicht bereitgestellt werden können:

- Schnelle Assayentwicklung auf einer einzigen Sensorplattform / Vorrichtung

## 11

- Bestimmung von Konzentrationskurven, bindungsspezifischem Crosstalk und Probenanalyse auf einer einzigen Sensorplattform / Vorrichtung
- Hochempfindliche Multianalytbestimmung in einer einzigen kleinvolumigen Probe
- Durchführung umfangreicher Messreihen auf einer einzigen Sensorplattform

Gegenstand der Erfindung ist eine Vorrichtung, umfassend einen planaren optischen Wellenleiter als Bestandteil einer Sensorplattform und eine mit der Sensorplattform direkt oder über ein dichtendes Medium vermittelt in Kontakt stehende, direkt dicht verschliessende oder über das dichtende Medium dicht verschlossene Schicht (g) (gemäss Abbildung 1) mit einer Vielzahl von mindestens zur Seite der Sensorplattform offenen Aussparungen, welche eine Vielzahl von Probenbehältnissen in einer zweidimensionalen Anordnung bilden, dadurch gekennzeichnet, dass in jeweils fünf oder mehr diskreten Messbereichen (d) in einem einzelnen Probenbehältnis unterschiedliche biochemische oder biologische Erkennungselemente zur spezifischen Erkennung und Bindung unterschiedlicher Analyten immobilisiert sind, wobei die besagten Messbereiche in optischer Wechselwirkung mit dem Anregungslicht aus dem optischen Wellenleiter, als Bestandteil einer Sensorplattform, stehen, welche eine Begrenzungsfläche dieser Probenbehältnisse bildet, wobei den Probenbehältnissen zugeführte Proben- oder Reagensflüssigkeiten abgeführt und nachfolgend weitere Proben- oder Reagensflüssigkeiten, gegebenenfalls ohne Waschschrte, den gleichen besagten Probenbehältnissen zugeführt werden können.

Von den jeweils fünf oder mehr Messbereichen in einem einzelnen Probenbehältnis können jeweils ein oder mehr Messbereiche zur Referenzierung verwendet werden.

Vorteilhaft werden Messbereiche zur Referenzierung gleicher chemischer oder optischer Parameter in mehreren über die Sensorplattform verteilten Probenbehältnissen verwendet, so dass die örtliche Verteilung besagter chemischer oder optischer Parameter auf der Sensorplattform bestimmt werden kann. Als zu bestimmender optischer Parameter ist dabei beispielsweise die Intensität des lokal verfügbaren Anregungslichts zu

## 12

verstehen. Insbesondere können aus der so bestimmten Verteilung besagter chemischer Parameter beispielsweise Unterschiede in Zusammensetzung, Konzentration oder Volumen verschiedener Proben, beispielsweise resultierend aus der Probenvorbereitung, die in unterschiedliche Probenbehältnisse gegeben werden, berücksichtigt werden.

Es wird eine solche Ausführungsform der Vorrichtung bevorzugt, bei der die besagten Messbereiche in optischer Wechselwirkung mit dem evaneszenten Feld von in dem planaren optischen Wellenleiter geführtem Anregungslicht stehen.

Der optische Wellenleiter als Bestandteil der Sensorplattform kann ein multimodaler oder monomodaler Wellenleiter aus einem zumindest bei der Anregungs- und der Lumineszenzwellenlänge transparentem anorganischem Material, vorzugsweise Glas, oder organischem Material, vorzugsweise Kunststoff, besonders vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe, die von Polymethylmetacrylat, Polycarbonat, Polystyrol gebildet wird, sein. Insbesondere kann dann der optische Wellenleiter als Bestandteil der Sensorplattform selbsttragend sein.

Bevorzugt wird eine Vorrichtung, in welcher der optische Wellenleiter als Bestandteil der Sensorplattform ein optischen Schichtwellenleiter mit einer ersten optisch transparenten Schicht (a) (gemäss Abbildung 1) auf einer zweiten optisch transparenten Schicht (b) (gemäss Abbildung 1) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a) ist.

Das Material der zweiten optisch transparenten Schicht (b) kann aus Glas, Quarz oder einem transparenten thermoplastischer Kunststoff, bevorzugt aus der Gruppe, die von Polycarbonat, Polyimid, Polymethylmethacrylat oder Polystyrol gebildet wird, bestehen.

Zur Erzeugung eines möglichst starken evaneszenten Feldes an der Oberfläche der optisch transparenten Schicht (a) ist es wünschenswert, dass der Brechungsindex der wellenleitenden, optisch transparenten Schicht (a) wesentlich grösser als der Brechungsindex der benachbarten Schichten ist. Insbesondere ist es von Vorteil, wenn der Brechungsindex der ersten optisch transparenten Schicht (a) grösser als 1.8 ist.

Beispielsweise kann die erste optisch transparente Schicht (a) aus  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ ,  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ,  $\text{HfO}_2$ , oder  $\text{ZrO}_2$  bestehen. Besonders bevorzugt wird, wenn die erste transparente optische Schicht (a) aus  $\text{Ta}_2\text{O}_5$  oder  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  besteht.

Neben dem Brechungsindex der wellenleitenden optisch transparenten Schicht (a) ist deren Dicke der zweite massgebliche Parameter zur Erzeugung eines möglichst starken evaneszenten Feldes an deren Grenzflächen zu benachbarten Schichten mit niedrigerem Brechungsindex. Dabei nimmt die Stärke des evaneszenten Feldes mit abnehmender Dicke der wellenleitenden Schicht (a) zu, solange die Schichtdicke ausreicht, um mindestens einen Mode der Anregungswellenlänge zu führen. Dabei ist die minimale "Cut-off"-Schichtdicke zur Führung eines Modes abhängig von der Wellenlänge dieses Modes. Sie ist für längerwelliges Licht grösser als für kurzwelliges Licht. Mit Annäherung an die "Cut-off"-Schichtdicke nehmen allerdings auch ungewünschte Ausbreitungsverluste stark zu, was die Auswahl der bevorzugten Schichtdicke zusätzlich nach unten begrenzt. Bevorzugt sind solche Schichtdicken der optisch transparenten Schicht (a), welche nur die Führung von 1 bis 3 Moden einer vorgegebenen Anregungswellenlänge ermöglichen, ganz besonders bevorzugt sind Schichtdicken, welche in monomodalen Wellenleitern für diese Anregungswellenlänge führen. Dabei ist klar, dass sich der diskrete Modencharakter des geführten Lichts nur auf die transversalen Moden bezieht.

Diese Anforderungen führen dazu, dass vorteilhaft die Dicke der ersten optisch transparenten Schicht (a) 40 bis 300 nm beträgt. Ganz besonders vorteilhaft beträgt die Dicke der ersten optisch transparenten Schicht (a) 100 bis 200 nm.

Die Höhe der Ausbreitungsverluste eines in einer optisch wellenleitenden Schicht (a) geführten Modes wird in hohem Masse von der Oberflächenrauigkeit einer darunter liegenden Trägerschicht sowie von Absorption durch möglicherweise in dieser Trägerschicht vorhandene Chromophoren bestimmt, was zusätzlich das Risiko der Anregung unerwünschter Lumineszenz in dieser Trägerschicht, durch Eindringen des evaneszenten Feldes des in der Schicht (a) geführten Modes, in sich birgt. Weiterhin kann es zum Auftreten thermischer Spannungen infolge unterschiedlicher thermischer Ausdehnungskoeffizienten der optisch

transparenten Schichten (a) und (b) kommen. Im Falle einer chemisch empfindlichen optisch transparenten Schicht (b), sofern sie beispielsweise aus einem transparenten thermoplastischen Kunststoff besteht, ist es wünschenswert, ein Eindringen von Lösungsmitteln, welche die Schicht (b) angreifen könnten, durch eventuell in der optisch transparenten Schicht (a) vorhandene Mikroporen zu verhindern.

Daher ist es von Vorteil, wenn sich zwischen den optisch transparenten Schichten (a) und (b) und in Kontakt mit Schicht (a) eine weitere optisch transparente Schicht (b') (gemäß Abbildung 1) mit niedrigerem Brechungsindex als dem der Schicht (a) und einer Stärke von 5 nm – 10 000 nm, vorzugsweise von 10 nm - 1000 nm, befindet. Die Zwischenschicht hat die Aufgabe einer Verringerung der Oberflächenrauigkeit unter der Schicht (a) oder der Verminderung des Eindringens des evaneszenten Feldes von in Schicht (a)geführtem Licht in die eine oder mehrere darunter liegende Schichten oder einer Verbesserung der Haftung der Schicht (a) auf der einen oder mehreren darunter liegenden Schichten oder der Verminderung von thermisch hervorgerufenen Spannungen innerhalb der optischen Sensorplattform oder der chemischen Isolation der optisch transparenten Schicht (a) von darunter liegenden Schichten mittels Abdichten von Mikroporen in der Schicht (a) gegen darunter liegende Schichten.

Es gibt eine Vielzahl von Methoden zur Aufbringung der biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen auf die optisch transparente Schicht (a). Beispielsweise kann dieses durch physikalische Adsorption oder durch elektrostatische Wechselwirkung erfolgen. Die Orientierung der Erkennungselemente ist dann im allgemeinen statistisch. Ausserdem besteht die Gefahr, dass bei unterschiedlicher Zusammensetzung der den Analyten enthaltenden Probe oder der im Nachweisverfahren eingesetzten Reagentien ein Teil der immobilisierten Erkennungselemente fortgespült wird. Daher kann es von Vorteil sein, wenn zur Immobilisierung biologischer oder biochemischer oder synthetischer Erkennungselemente auf der optisch transparenten Schicht (a) eine Haftvermittlungsschicht (f) (gemäß Abbildung 1) aufgebracht ist. Diese Haftvermittlungsschicht sollte ebenfalls optisch transparent sein. Insbesondere sollte die Haftvermittlungsschicht nicht über die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes aus der wellenleitenden Schicht (a) in das darüber liegende Medium hinausragen. Daher sollte die Haftvermittlungsschicht (f) eine Stärke von



weniger als 200 nm, vorzugsweise von weniger als 20 nm, haben. Sie kann sich beispielsweise aus chemischen Verbindungen aus den Gruppen Silane, Epoxide, "selbstorganisierte funktionalisierte Monoschichten" zusammensetzen.

Wie in der Definition der Messbereiche festgestellt, ist es möglich, durch räumlich selektive Aufbringung von biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen auf der Sensorplattform räumlich getrennte Messbereiche (d) zu erzeugen. Im Kontakt mit einem lumineszenzfähigen Analyten oder eines mit dem Analyten um die Bindung an die immobilisierten Erkennungselemente konkurrierenden lumineszenzmarkierten Analogen des Analyten oder eines weiteren lumineszenzmarkierten Bindungspartners in einem mehrstufigen Assay werden diese lumineszenzfähigen Moleküle nur selektiv in den Messbereichen an die Oberfläche der Sensorplattform binden, welche durch die Flächen definiert werden, die von den immobilisierten Erkennungselementen eingenommen werden.

Zur Aufbringung der biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente können eines oder mehrere Verfahren verwendet werden aus der Gruppe von Verfahren, die von "Ink jet spotting, mechanischem Spotting mittels Stift oder Feder, micro contact printing, fluidische Kontaktierung der Messbereiche mit den biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen durch deren Zufuhr in parallelen oder gekreuzten Mikrokanälen, unter Einwirkung von Druckunterschieden oder elektrischen oder elektromagnetischen Potentialen", gebildet werden.

Als biologische oder biochemische oder synthetische Erkennungselementen können Komponenten aus der Gruppe aufgebracht werden, die von Nukleinsäuren (DNA, RNA), Nukleinsäureanaloge (PNA), Antikörpern, Aptameren, membran-gebundenen und isolierten Rezeptoren, deren Liganden, Antigene für Antikörper, "Histidin-Tag-Komponenten", durch chemische Synthese erzeugte Kavitäten zur Aufnahme molekularer Imprints, etc. gebildet wird.

Unter der letztgenannten Art von Erkennungselementen sind Kavitäten zu verstehen, die in einem Verfahren hergestellt werden, welches als "molecular imprinting" in der Literatur beschrieben wurde. Dazu wird,

## 16

meistens in organischer Lösung, der Analyt oder ein Analogon des Analyten, in einer Polymerenstruktur eingekapselt. Man bezeichnet ihn dann als "Imprint". Dann wird der Analyt oder sein Analogon unter Zugabe geeigneter Reagentien aus der Polymerenstruktur wieder herausgelöst, so dass er dort eine leere Kavität zurücklässt. Diese leere Kavität kann dann als eine Bindungsstelle mit hoher sterischer Selektivität in einem späteren Nachweisverfahren eingesetzt werden.

Es ist auch möglich, dass als biochemische oder biologische Erkennungselemente ganze Zellen oder Zellfragmente aufgebracht werden. In vielen Fällen wird die Nachweisgrenze eines analytischen Verfahrens limitiert durch Signale sogenannter unspezifischer Bindung, d. h. durch Signale, welche durch Bindung des Analyten oder anderer zum Nachweis des Analyten eingesetzter Verbindungen erzeugt werden, welche nicht nur im Bereich der eingesetzten immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen, sondern auch in davon unbedeckten Bereichen einer Sensorplattform gebunden werden, beispielsweise durch hydrophobe Adsorption oder durch elektrostatische Wechselwirkungen. Daher ist es von Vorteil, wenn zwischen den räumlich getrennten Messbereichen (d) gegenüber dem Analyten "chemisch neutrale" Verbindungen zur Verminderung unspezifischer Bindung oder Adsorption aufgebracht sind. Als "chemisch neutrale" Verbindungen werden dabei solche Stoffe bezeichnet, welche selbst keine spezifischen Bindungsstellen zur Erkennung und Bindung des Analyten oder eines Analogen des Analyten oder eines weiteren Bindungspartners in einem mehrstufigen Assay aufweisen und durch ihre Anwesenheit den Zugang des Analyten oder seines Analogen oder der weiteren Bindungspartner zur Oberfläche der Sensorplattform blockieren.

Als "chemisch neutrale" Verbindungen können beispielsweise Stoffe aus den Gruppen eingesetzt werden, die zum Beispiel von Albuminen, insbesondere Rinderserumalbumin, Heringssperma oder auch von Polyethylenglycolen gebildet werden.

Es wird bevorzugt, dass die Einkopplung des Anregungslichts zu den Messbereichen (d) mithilfe von einer oder mehreren Gitterstrukturen (c) (gemäß Abbildung 1) erfolgt, die in der optisch transparenten Schicht (a) ausgeprägt sind.

## 17

Ein optisches Übersprechen von einem Messbereich zu anderen Messbereichen kann durch die Ausbreitung von in den Wellenleiter eingekoppeltem Licht, insbesondere auch von rückgekoppeltem Lumineszenzlicht, erfolgen. Zur Verhinderung eines solchen Übersprechens ist es von Vorteil, wenn Auskopplung von in der optisch transparenten Schicht (a) geführtem Licht mithilfe von Gitterstrukturen (c') (gemäß Abbildung 1) erfolgt, die in der optisch transparenten Schicht (a) ausgeprägt sind. Dabei können in der optisch transparenten Schicht (a) ausgeprägte Gitterstrukturen (c) und (c') gleiche oder unterschiedliche Periode haben und parallel oder nicht parallel zueinander ausgerichtet sein.

Insbesondere können Gitterstrukturen (c) und (c') wechselseitig als Ein- und / oder Auskoppelgitter verwendet werden .

Die Gitterstrukturen (c) und gegebenenfalls zusätzlich vorhandene Gitterstrukturen (c') weisen vorteilhaft eine Periode von 200 nm – 1000 nm auf, und die Modulationstiefe der Gitter beträgt vorteilhaft 3 bis 100 nm, bevorzugt 10 bis 30 nm.

Es wird bevorzugt, dass das Verhältnis von Modulationstiefe zur Dicke der ersten optisch transparenten Schicht (a) gleich oder kleiner als 0,2 ist.

Eine Gitterstruktur (c) kann ein Reliefgitter mit Rechteck-, Dreieck- oder halbkreisförmigem Profil oder ein Phasen- oder Volumengitter mit einer periodischen Modulation des Brechungsindex in der im wesentlichen planaren optisch transparenten Schicht (a) sein.

Zur Verstärkung einer Lumineszenz oder zur Verbesserung des Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisses kann es weiterhin von Vorteil sein, wenn zwischen der optisch transparenten Schicht (a) und den immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen eine dünne Metallschicht, vorzugsweise aus Gold oder Silber, gegebenenfalls auf einer zusätzlichen dielektrischen Schicht mit niedrigerem Brechungsindex als der Schicht (a), beispielsweise aus Silica oder Magnesiumfluorid, aufgebracht ist, wobei die Dicke der Metallschicht und der eventuellen weiteren Zwischenschicht so ausgewählt ist, dass ein Oberflächenplasmon bei der Anregungswellenlänge und / oder der Lumineszenzwellenlänge angeregt werden kann.

## 18

Für viele Anwendungen ist es von Vorteil, wenn die Gitterstruktur (c) ein diffraktives Gitter mit einer einheitlichen Periode ist. Der Resonanzwinkel zur Einkopplung des Anregungslichts über die Gitterstruktur (c) zu den Messbereichen ist dann im gesamten Bereich der Gitterstruktur einheitlich. Will man jedoch beispielsweise das Anregungslicht verschiedener Lichtquellen mit deutlich unterschiedlicher Wellenlänge einkoppeln, so können sich die entsprechenden Resonanzwinkel für die Einkopplung deutlich unterscheiden, was die Verwendung zusätzlicher Justierelemente in einem optischen System zur Aufnahme der Sensorplattform erforderlich machen kann oder zu räumlich sehr ungünstigen Koppelwinkeln führen kann. Beispielsweise zur Verringerung stark unterschiedlicher Koppelwinkel kann es daher von Vorteil sein, wenn die Gitterstruktur (c) ein multidiffraktives Gitter ist.

Für Anwendungen, in denen Änderungen von Ein- und Auskoppelwinkeln infolge eines Kontakts mit der Probe vermieden werden sollen, kann es vorteilhaft sein, wenn sich die Gitterstrukturen (c) und gegebenenfalls zusätzlich vorhandenen Gitterstrukturen (c') ausserhalb des Bereichs der Probenbehältnisse befinden.

Für andere Anwendungen, insbesondere bei grossflächiger Anregung wird demgegenüber bevorzugt, wenn sich Gitterstrukturen (c) und gegebenenfalls zusätzlich vorhandene Gitterstrukturen (c') über den Bereich mehrerer oder alle Probenbehältnisse erstrecken.

Soll über eine Gitterstruktur (c) eingekoppeltes Anregungslicht die optisch transparente Schicht (a) durchgehend über Bereiche durchlaufen, die sich über mehrere Probenbehältnisse erstrecken, so ist es notwendig, dass das Material der mit der Sensorplattform in Kontakt stehenden, dicht verschliessenden Schicht (g) an der Auflageoberfläche zu der Sensorplattform mindestens in der Eindringtiefe des evaneszenten Feldes sowohl für die Anregungsstrahlung als auch für die angeregte Lumineszenzstrahlung transparent ist.

Zur Verminderung von Reflexionen oder Streulicht ist es dann von Vorteil, wenn die Schicht (g) als zweilagige Schicht vorliegt, deren erste, welche mit der Oberfläche der Sensorplattform in Kontakt gebracht wird, sowohl für die Anregungsstrahlung als auch für die angeregte Lumineszenzstrahlung transparent ist, während die dann anschliessende, sich im weiteren Abstand

## 19

von der Sensorplattform befindliche Schicht im Spektralbereich der Anregungsstrahlung und der angeregten Lumineszenzstrahlung absorbierend ist.

Für Anwendungen, in denen die Ausbreitung von Anregungslicht und gegebenenfalls erzeugtem und in die optisch transparente, wellenleitende Schicht (a) rückgekoppeltem Lumineszenzlicht in dieser Schicht jeweils auf den Bereich eines einzelnen Probenbehältnisses beschränkt werden soll, ist es demgegenüber von Vorteil, wenn das Material der mit der Sensorplattform in Kontakt stehenden, dicht verschliessenden Schicht (g) im Spektralbereich der Anregungsstrahlung und der angeregten Lumineszenzstrahlung absorbierend ist.

Vorteilhaft ist, wenn das Material der mit der Sensorplattform in Kontakt stehenden, dicht verschliessenden Schicht (g) auf der Sensorplattform selbsthaftend ist.

Daher wird insbesondere bevorzugt, dass das Material der mit der Sensorplattform in Kontakt stehenden, dicht verschliessenden Schicht (g) aus einem Polysiloxan besteht.

Es wird bevorzugt, dass sich in einem Probenbehältnis 5 - 1000, bevorzugt 10 - 400 Messbereiche befinden.

Weiterhin wird bevorzugt, dass ein einzelner Messbereich in einem Probenbehältnis eine Fläche von  $0.001 - 6 \text{ mm}^2$  einnimmt, wobei die Messbereiche gleiche oder unterschiedliche Grösse haben.

Die Probenbehältnisse haben vorteilhaft jeweils ein Volumen von 100 nl - 1 ml.

Die erfindungsgemässe Vorrichtung kann sowohl als geschlossenes Fliesssystem als auch als offenes System betrieben werden. Im ersten Fall ist die Vorrichtung so gestaltet, dass die Probenbehältnisse auf der von der optisch transparenten Schicht (a) abgewandten Seite, mit Ausnahme von Ein- und / oder Auslassöffnungen für die Zufuhr oder den Auslass der Proben und gegebenenfalls zusätzlicher Reagentien, geschlossen sind und die Zufuhr oder der Auslass von Proben und gegebenenfalls zusätzlicher Reagentien in einem geschlossenen Durchflusssystem erfolgen, wobei im

## 20

Fälle der Flüssigkeitszufuhr zu mehreren Messbereichen oder Segmenten mit gemeinsamen Einlass- und Auslassöffnungen diese bevorzugt spalten- oder zeilenweise adressiert werden.

Dabei kann die Zufuhr der Proben und gegebenenfalls zusätzlichen Reagentien in parallelen oder gekreuzten Mikrokanälen, unter Einwirkung von Druckunterschieden oder elektrischen oder elektromagnetischen Potentialen erfolgen.

Im Falle eines offenen Systems ist die erfindungsgemässe Vorrichtung so gestaltet, dass die Probenbehältnisse auf der von der optisch transparenten Schicht (a) abgewandten Seite Öffnungen zur lokal adressierten Zugabe oder Entfernung der Proben oder anderer Reagentien besitzen. Zusätzlich können Behältnisse für Reagentien vorgesehen sein, welche während des Verfahrens zum Analytnachweis mit den Messbereichen in Kontakt gebracht werden.

Auf der Sensorplattform sind vorteilhaft optisch oder mechanisch erkennbare Markierungen zur Erleichterung der Justierung in einem optischen System und / oder zur Verbindung mit der die Ausnehmungen für die Probenbehältnisse enthaltenden Schicht (g) aufgebracht.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein analytisches System zur Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen, mit

- mindestens einer Anregungslichtquelle
- einer Vorrichtung nach einem der vorgenannten Ausführungsformen
- mindestens einem Detektor zur Erfassung des von dem mindestens einem oder mehreren Messbereichen (d) auf der Sensorplattform ausgehenden Lichts.

Dabei ist es von Vorteil, wenn das von der mindestens einen Lichtquelle ausgesandte Anregungslicht kohärent ist und unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die optisch transparente Schicht (a) auf die einen oder mehreren Messbereiche eingestrahlt wird.

Um eine Vielzahl von Messbereichen oder alle Messbereiche gleichzeitig anzuregen und deren Lumineszenz gleichzeitig zu bestimmen, wird es bevorzugt, dass das Anregungslicht von mindestens einer Lichtquelle mit einer Aufweitungsoptik zu einem im wesentlichen parallelen Strahlenbündel

## 21

aufgeweitet wird und unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die optisch transparente Schicht (a) auf die einen oder mehreren Messbereiche eingestrahlt wird.

Zur Verminderung von Lumineszenzsignalen ausserhalb der Messbereiche kann es jedoch auch vorteilhaft sein, wenn das Anregungslicht von der mindestens einen Lichtquelle durch ein oder, im Falle mehrerer Lichtquellen, gegebenenfalls mehrere diffraktive optische Elemente, vorzugsweise Dammann-Gitter, oder refraktive optische Elemente, vorzugsweise Mikrolinsen-Arrays, in eine Vielzahl von Einzelstrahlen möglichst gleicher Intensität der von einer gemeinsamen Lichtquelle stammenden Teilstrahlen zerlegt wird, welche jeweils im wesentlichen parallel zueinander auf räumlich getrennte Messbereiche eingestrahlt werden.

Im Falle unzureichender Intensität einer einzigen Lichtquelle oder des Bedarfs nach Lichtquellen unterschiedlicher Emissionswellenlängen, beispielsweise für biologische Applikationen ist es vorteilhaft, wenn als Anregungslichtquellen zwei oder mehrere kohärente Lichtquellen mit gleicher oder unterschiedlicher Emissionswellenlänge verwendet werden.

Um die Signale von einer Vielzahl von Messbereichen getrennt aufzunehmen, wird bevorzugt, dass zur Detektion mindestens ein ortsauflösender Detektor verwendet wird.

Dabei kann als der mindestens eine ortsauflösende Detektor mindestens ein Detektor aus der Gruppe verwendet werden, die von CCD-Kameras, CCD-Chips, Photodioden-Arrays, Avalanche-Dioden-Arrays, Multichannelplates und Vielkanal-Photomultipliern gebildet wird.

In dem erfindungsgemässen analytischen System nach einer der genannten Ausführungen können zwischen der einen oder mehreren Anregungslichtquellen und der Sensorplattform nach einer der vorgenannten Ausführungen und /oder zwischen besagter Sensorplattform und dem einen oder mehreren Detektoren optische Komponenten aus der Gruppe verwendet werden, die von Linsen oder Linsensystemen zur Formgestaltung der übertragenen Lichtbündel, planaren oder gekrümmten Spiegeln zur Umlenkung und gegebenenfalls zusätzlich zur Formgestaltung von Lichtbündeln, Prismen zur Umlenkung und gegebenenfalls zur spektralen Aufteilung von Lichtbündeln, dichroischen Spiegeln zur spektral

## 22

selektiven Umlenkung von Teilen von Lichtbündeln, Neutralfiltern zur Regelung der übertragenen Lichtintensität, optischen Filtern oder Monochromatoren zur spektral selektiven Übertragung von Teilen von Lichtbündeln oder polarisationsselektiven Elementen zur Auswahl diskreter Polarisationsrichtungen des Anregungs- oder Lumineszenzlichts gebildet werden.

Für eine Reihe von Anwendungen ist es von Vorteil, wenn die Einstrahlung des Anregungslichts in Pulsen mit einer Dauer zwischen 1 fsec und 10 Minuten erfolgt.

Für kinetische Messungen oder für die Diskriminierung rasch abklingender Fluoreszenz von fluoreszenten Verunreinigungen in der Probe oder in Materialien von Komponenten des optischen Systems oder der Sensorplattform selbst kann es von Vorteil sein, wenn das Emissionslicht aus den Messbereichen zeitlich aufgelöst gemessen wird.

Weiterhin wird es bevorzugt, dass das erfindungsgemäße optische System Komponenten umfasst, mit denen zur Referenzierung des verfügbaren Anregungslichts Lichtsignale aus der Gruppe gemessen werden, die von Anregungslicht am Ort der Lichtquellen oder nach ihrer Aufweitung oder nach ihrer Unterteilung in Teilstrahlen, Streulicht bei der Anregungswellenlänge aus dem Bereich der einen oder mehreren räumlich getrennten Messbereiche, und über die Gitterstruktur (c) neben den Messbereichen ausgekoppeltem Licht der Anregungswellenlänge gebildet werden. Besonders von Vorteil ist dabei, wenn die Messbereiche zur Bestimmung des Emissionslichts und des Referenzsignals identisch sind.

Es ist auch möglich, dass die Einstrahlung des Anregungslichts auf und Detektion des Emissionslichts von einem oder mehreren Messbereichen sequentiell für einzelne oder mehrere Messbereiche erfolgt. Dabei kann die sequentielle Anregung und Detektion unter Verwendung beweglicher optischer Komponenten erfolgen, die aus der Gruppe von Spiegeln, Umlenkprismen und dichroischen Spiegeln gebildet wird. Üblicherweise werden für sequentielle Anregung und Detektion in bioanalytischen Array-Systemen kommerziell erhältliche sogenannte Scanner eingesetzt, mit denen, meistens mittels beweglicher Spiegel, ein Anregungslichtstrahl sequentiell über die zu untersuchende Fläche geführt wird. Bei den meisten Scannersystemen ändert sich dabei der Winkel zwischen der beleuchteten



Fläche und dem Anregungslichtstrahl. Zur Erfüllung der Resonanzbedingung für die Einkopplung des Anregungslichts in die wellenleitende Schicht der erfindungsgemässen Sensorplattform muss dieser Winkel jedoch im wesentlichen konstant bleiben, d. h. ein in dem erfindungsgemässen optischen System zu verwendender Scanner muss winkelgetreu arbeiten. Diese Forderung wird von einigen kommerziell erhältlichen Scannern erfüllt. Zugleich darf sich jedoch auch nicht die Grösse der angeregten Fläche auf der Sensorplattform ändern. Daher ist ein weiterer Gegenstand dieser Erfindung ein optisches System, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass sequentielle Anregung und Detektion unter Verwendung eines im wesentlichen winkel- und fokusgetreuen Scanners erfolgt.

Eine andere mögliche Ausführungsform ist, dass die Sensorplattform zwischen Schritten der sequentiellen Anregung und Detektion bewegt wird. In diesem Fall können die eine oder mehreren Anregungslichtquellen und die zur Detektion verwendeten Komponenten räumlich fixiert sein.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Lumineszenznachweis eines oder mehrerer Analyten in einer oder mehreren Proben auf mindestens fünf oder mehr, räumlich getrennten Messbereichen mit einer Vorrichtung, umfassend einen planaren optischen Wellenleiter als Bestandteil einer Sensorplattform und eine mit der Sensorplattform direkt oder über ein dichtendes Medium vermittelt in Kontakt stehende, direkt dicht verschliessende oder über das dichtende Medium dicht verschlossene Schicht (g) mit einer Vielzahl von mindestens zur Seite der Sensorplattform offenen Aussparungen, welche eine Vielzahl von Probenbehältnissen in einer zweidimensionalen Anordnung bilden, dadurch gekennzeichnet, dass in jeweils fünf oder mehr diskreten Messbereichen (d) in einem einzelnen Probenbehältnis unterschiedliche biochemische oder biologische Erkennungselemente zur spezifischen Erkennung und Bindung unterschiedlicher Analyten immobilisiert sind, wobei besagte Messbereiche in optischer Wechselwirkung mit dem Anregungslicht aus dem optischen Wellenleiter, als Bestandteil einer Sensorplattform, stehen, welche eine Begrenzungsfläche dieser Probenbehältnisse bildet, wobei den Probenbehältnissen zugeführte Proben- oder Reagensflüssigkeiten abgeführt und nachfolgend weitere Proben- oder Reagensflüssigkeiten den gleichen besagten Probenbehältnissen zugeführt werden können, und dass Anregungslicht in die Messbereiche geleitet wird, hierbei

## 24

lumineszenzfähige Stoffe in den Proben oder auf den Messbereichen zur Lumineszenz angeregt und die abgestrahlte Lumineszenz gemessen wird.

Dabei wird bevorzugt, dass die besagten Messbereiche in optischer Wechselwirkung mit dem evaneszenten Feld von in dem planaren optischen Wellenleiter geführtem Anregungslicht stehen.

Bei den vorgenannten Verfahren ist es möglich, dass (1) die isotrop abgestrahlte Lumineszenz oder (2) in die optisch transparente Schicht (a) eingekoppelte und über die Gitterstruktur (c) ausgekoppelte Lumineszenz oder Lumineszenzen beider Anteile (1) und (2) gleichzeitig gemessen werden.

In dem erfindungsgemässen Verfahren kann zur Erzeugung der Lumineszenz oder Fluoreszenz ein Lumineszenz- oder Fluoreszenzlabel verwendet werden, das bei einer Wellenlänge zwischen 300 nm und 1100 nm angeregt werden kann und emittiert.

Bei den Lumineszenz- oder Fluoreszenzlabeln kann es sich um herkömmliche Lumineszenz- oder Fluoreszenzfarbstoffe oder auch um sogenannte lumineszente oder fluoreszente Nanopartikel, basierend auf Halbleitern (W. C. W. Chan und S. Nie, "Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection", *Science* 281 (1998) 2016 – 2018) handeln.

Das Lumineszenzlabel kann an den Analyten oder in einem kompetitiven Assay an einen Analogen des Analyten oder in einem mehrstufigen Assay an einen der Bindungspartner der immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente oder an die biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente gebunden sein.

Zusätzlich können ein zweites oder noch weitere Lumineszenzlabel mit gleicher oder unterschiedlicher Anregungswellenlänge wie das erste Lumineszenzlabel und gleicher oder unterschiedlicher Emissionswellenlänge verwendet werden. Hierbei kann es vorteilhaft sein, wenn das zweite oder noch weitere Lumineszenzlabel bei der gleichen Wellenlänge wie das erste Lumineszenzlabel angeregt werden können, aber bei anderen Wellenlängen emittieren.

## 25

Für andere Applikationen ist es vorteilhaft, wenn die Anregungsspektren und Emissionsspektren der eingesetzten Lumineszenzlabel nur wenig oder gar nicht überlappen.

In dem erfindungsgemässen Verfahren kann es weiterhin vorteilhaft sein, wenn zum Nachweis des Analyten Ladungs- oder optischer Energietransfer von einem als Donor dienenden ersten Lumineszenzlabel zu einem als Akzeptor dienenden zweiten Lumineszenzlabel verwendet wird.

Zusätzlich kann es von Vorteil sein, wenn neben der Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen Änderungen des effektiven Brechungsindex auf den Messbereichen bestimmt werden. Von weiterem Vorteil kann dabei sein, wenn die einen oder mehreren Lumineszenzen und / oder Bestimmungen von Lichtsignalen bei der Anregungswellenlänge polarisationsselektiv vorgenommen werden. Weiterhin erlaubt das Verfahren die Möglichkeit, dass die einen oder mehreren Lumineszenzen bei einer anderen Polarisation als der des Anregungslichts gemessen werden.

Das erfindungsgemässe Verfahren nach einer der voranstehenden Ausführungsformen ermöglicht eine gleichzeitige oder sequentielle, quantitative oder qualitative Bestimmung eines oder mehrerer Analyten aus der Gruppe von Antikörpern oder Antigenen, Rezeptoren oder Liganden, Chelatoren oder "Histidin-Tag-Komponenten", Oligonukleotiden, DNA- oder RNA-Strängen, DNA- oder RNA-Analoga, Enzymen, Enzymcofaktoren oder Inhibitoren, Lektinen und Kohlehydraten.

Das oben beschriebene Verfahren erlaubt es, direkt biologisches Material ohne biologische oder biochemische Vervielfältigungsmechanismen (z.B. das Polymerase Chain Reaction (PCR)) zu bestimmen. Neben der Vereinfachung der Vorgehensweise wird hier eine lineare Korrelation vom mRNA und beobachtetem Signal erreicht. Das bedeutet, dass auch sog. "rare messages", d.h. biologisch relevante mRNAs, die in sehr geringen Konzentrationen auftreten, hochempfindlich und quantitativ bestimmt werden können. Die parallele Durchführung der Messungen auf einer 96 Well Plate Plattform ermöglicht es, Ergebnisse in bisher unbekannter Qualität und Durchsatz zu erhalten (siehe Ausführungsbeispiel 1e). Als Konsequenz ist daher klar ersichtlich, dass die bei präklinischen und klinischen Studien anfallenden grossen Problemengungen sehr viel schneller

## 26

und präziser als mit den bis anhin verwendeten manuellen Verfahren abgearbeitet werden können. Die Detektion zweier Fluoreszenzmarker auf einem Substanzfleck ermöglicht zudem die direkte Bestimmung der relativen Induktion in einer Einzelmessung (siehe Beispiel 2e). Eine Referenzierung von Chip zu Chip ist deshalb nicht notwendig. Die Qualitätsansprüche an Batch-zu-Batch-Reproduzierbarkeit der Sensorplattformen können deshalb signifikant reduziert werden.

Die zu untersuchenden Proben können natürlich vorkommende Körperflüssigkeiten wie Blut, Serum, Plasma, Lymphe oder Gewebeflüssigkeiten oder Urin oder Eigelb sein.

Eine zu untersuchende Probe kann aber auch eine optisch trübe Flüssigkeit, Oberflächenwasser, ein Boden- oder Pflanzenextrakt, eine Bio- oder Syntheseprozessbrühe sein.

Die zu untersuchenden Proben können auch aus biologischen Gewebeteilen entnommen sein.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung eines Verfahrens nach mindestens einer der voranstehenden Ausführungsformen zu quantitativen oder qualitativen Analysen zur Bestimmung chemischer, biochemischer oder biologischer Analyten in Screeningverfahren in der Pharmaforschung, der Kombinatorischen Chemie, der Klinischen und Präklinischen Entwicklung, zu Echtzeitbindungsstudien und zur Bestimmung kinetischer Parameter im Affinitätsscreening und in der Forschung, zu qualitativen und quantitativen Analytbestimmungen, insbesondere für die DNA- und RNA-Analytik und die Bestimmung von genomischen oder proteomischen Unterschieden im Genom, wie beispielsweise Einzelnukleotid-Polymorphismen, zur Messung von Protein-DNA-wechselwirkungen, zur Bestimmung von Steuerungsmechanismen für die m-RNA-Expression und für die Protein(bio)synthese, für die Erstellung von Toxizitätsstudien sowie für die Bestimmung von Expressionsprofilen, insbesondere zur Bestimmung von biologischen und chemischen Markerstoffen, wie mRNA, Proteinen, Peptiden oder niedermolekularen organischen (Boten-)Stoffen, sowie zum Nachweis von Antikörpern, Antigenen, Pathogenen oder Bakterien in der pharmazeutischen Produktforschung und -entwicklung, der Human- und Veterinärdiagnostik, der Agrochemischen Produktforschung und -entwicklung, der

**27**

symptomatischen und präsymptomatischen Pflanzendiagnostik, zur Patientenstratifikation in der pharmazeutischen Produktentwicklung und für die therapeutische Medikamentenauswahl, zum Nachweis von Pathogenen, Schadstoffen und Erregern, insbesondere von Salmonellen, Prionen, Viren und Bakterien, insbesondere in der Lebensmittel- und Umweltanalytik.

Mit den nachfolgenden Ausführungsbeispielen soll die Erfindung genauer erläutert und demonstriert werden.

## 28

### **Beispiel 1: Vorrichtung und Verfahren zur gleichzeitigen Bestimmung von Unterschieden im Expressionsmuster ausgewählter m-RNA's aus verschiedenen Positionen von Tumorgewebe**

An verschiedenen Positionen eines extrahierten Tumors – in diesem Beispiel einer Prostata Drüse – wird Gewebe entnommen und auf Unterschiede im Expressionsmuster ausgewählter mRNAs als Funktion der Position im Tumorgewebe untersucht. Die Ergebnisse werden eine unabhängig von histologischen Untersuchungen auf reinen genetischen Informationen basierende Aussage erlauben. Die biologische Relevanz eines solchen Verfahrens und Aspekte der Probenvorbereitung sind in der Literatur beschrieben (Kristina A. Cole, David B. Krizmann, and Michael R. Emmert-Buck, „The genetics of cancer – a 3D model“ *Nature Genetics Supplement* 21 (1999) 38-41).

### **Herstellung und Aufbringung der biologischen Erkennungselemente auf einer Sensorplattform einer Vorrichtung mit je 400 diskreten Messbereichen in 96 Probenbehältnissen**

a) Klone von 100 Genen die – basierend auf in der Literatur beschriebenen Ergebnissen - eine Rolle in der Karzinogenese oder bei Entzündungsreaktionen spielen (siehe Kristina A. Cole, David B. Krizmann, and Michael R. Emmert-Buck, „The genetics of cancer – a 3D model“, *Nature Genetics Supplement* 21 (1999) 38-41, sowie dort zitierte weiterführende Literatur), sowie von solchen Genen, die typischerweise keine Rolle in diesen Prozessen spielen, deren Expressionsniveau im Idealfall konstant bleibt und deshalb zur Standardisierung herangezogen werden können (sogenannte “Housekeeping Genes” wie beispielsweise  $\beta$ -Actin, GAPDH, Tubulin- $\alpha$ , Ubiquitin, Phospholipase A2, etc.), werden ausgewählt als biologische Erkennungselemente, welche auf der Sensorplattform in diskreten Messbereichen immobilisiert werden sollen.

Zu der ersten Gruppe ausgewählter potentiell krankheitsrelevanter Gene gehören unter anderem Serin/Threonin-Kinase (STK2), die beta-Untereinheit von Proteasom (PSMB4), CD36-Antigen (Kollagen Typ I Rezeptor, Thrombospondin Rezeptor), Phospholipase A2 (PLA2G1B), Ribosomales Protein L17 (RPL17), Desmoglein 2 (DSG2), Tyro 3 Protein-Tyrosin-Kinase (TYRO3), Typ IV Kollagen (COL4A4), “Activating

## 2.9

Transcription Factor 3" (ATF3), Annexin 1 (ANX), weitere Reparaturenzyme, Kinasen etc.

Das erforderliche genetische Material kann in Plasmidform aus dem UniGene Set NIHs Cancer Genome Anatomy Projects oder alternativ aus kommerziellen Quellen, die das Material des I.M.A.G.E. Konsortiums vertreiben, bezogen werden. Die Überführung und Amplifikation der Gensequenzen im Plasmid zu den entsprechenden cDNAs erfolgt mittels der entsprechenden Primerpaare und erzeugt doppelsträngige Moleküle (Probe cDNAs) mit einer Länge zwischen etwa 300 und 1000 Basenpaaren.

b) Es wird eine Sensorplattform mit den äusseren Abmessungen 76 mm Breite x 112 mm Länge x 0.7 mm Dicke verwendet, auf deren Fläche die 96 Wells mit den Innendimensionen 7 x 7 mm einer klassischen Mikrotiterplatte Platz finden. Das Substratmaterial (optisch transparente Schicht (b)) besteht aus AF 45 Glas (Brechungsindex  $n = 1.52$  bei 633 nm). Im Substrat wird mittels holographischer Belichtung der mit aufgeschleudertem Photolack bedeckten Schicht (b) und anschliessendes nasschemisches Ätzen eine durchgehende Struktur eines Oberflächenreliefgitters einer Periode von 360 nm und einer Tiefe von 25 +/- 5 nm erzeugt, mit Orientierung der Gitterlinien parallel zur ausgewiesenen Breite der Sensorplattform. Die wellenleitende, optisch transparente Schicht (a) aus  $Ta_2O_5$  auf der optisch transparenten Schicht (b) wird durch reaktives, magnetfeldunterstütztes DC-Sputtern (siehe DE-A-44 10258) erzeugt und hat einen Brechungsindex von 2.15 bei 633 nm (Schichtdicke 150 nm). Infolge des Abscheidungsprozesses überträgt sich die Gitterstruktur auf die Oberfläche der wellenleitenden Schicht nahezu masstäblich im Verhältnis 1:1.

Zur Vorbereitung auf die Immobilisierung der biochemischen oder biologischen oder synthetischen Erkennungselemente wird die Sensorplattformen mit Chloroform im Ultraschallgerät gereinigt und mittels einer Silanisierungsreaktion mit Glycidylxypropyltrimethoxysilan chemisch aktiviert und so zur Immobilisierung der Probe cDNAs als biologische Erkennungselemente vorbereitet. Die einzelnen cDNAs in einer Konzentration von 50 ng/ $\mu$ l werden mittels einer kommerziellen piezogesteuerten Mikropipette (GeSim GmbH, Großberkmannsdorf, DE) mit jeweils 10 Tropfen zu 0.1 nl auf einen Punkt aufgebracht, was zu

### 30

Spotdurchmessern als diskreten Messbereichen von ca. 150  $\mu\text{m}$  führt. In einer 20 x 20 Spot-Anordnung (400 Feature Array) werden jeweils 4 Messbereiche mit gleicher cDNA erzeugt, so dass am Ende des Immobilisierungsvorganges die durch einen statistischen Algorithmus festgelegte Position der 100 verschiedenen als Erkennungselementen dienenden cDNAs bekannt, jedoch rein statistisch vorgegeben ist. Die Spots weisen einen Abstand der Spotmittelpunkte von 300  $\mu\text{m}$  auf und belegen so eine Fläche von 6 x 6 mm auf der Sensorplattform, welche mit der damit in Kontakt stehenden, dicht verschliessenden Schicht (g) aus Polydimethylsiloxan (PDMS) mit entsprechenden, die Arrays umschliessenden quadratischen Ausnehmungen von 7 mm x 7mm eine 96-Well-Platte bildet. Auf der Sensorplattform wird am Boden sämtlicher 96 Probenbehältnisse auf diese Weise ein identisches Raster diskreter Messbereiche erzeugt. Durch thermische Behandlung – Aufheizen auf 60 °C für 30 min. – kann die Immobilisierung optimiert werden.

#### c) Probenmaterial:

An verschiedenen Positionen einer Prostataadrüse (sowohl im phänotypisch auffallenden wie auch im phänotypisch nicht auffallenden Gewebe) wird Gewebematerial (ca 50 000 bis 100000 Zellen) z. B. in Form von Gewebefeinschnitten entnommen. Das Gewebe wird in gefrorenem Zustand mechanisch aufgeschlossen und über eine Standard Phenol / Chloroform-Extraktion wird "Total RNA" isoliert. Mittels einer Oligotex Spin Column (Qiagen, Hilden, DE) wird mRNA aus der Total RNA Fraktion isoliert. Mittels eines Reversed Transkriptase Verfahrens (z.B. Life Technologies) unter Anwesenheit einer Cy5 (Pharmacia Amersham) markierten Nukleobase (Cy5-dUTP) werden sämtliche mRNA Arten in fluoreszenzmarkierte cDNA Moleküle übergeführt. Das so erhaltene Material wird in Hybridisierungspuffer aufgenommen, so daß eine Gesamtkonzentration von maximal 10 ng/ $\mu\text{l}$  vorliegt als flüssige Probe.

#### d) Analytisches System

##### *Optisches System*

##### i) *Anregungseinheit*

Die Sensorplattform ist auf einer computergesteuerten Justiereinheit montiert, welche die Translation parallel und senkrecht zu den Gitterlinien sowie eine Rotation Drehachse parallel zu den Gitterlinien und durch den



### 3.1

Schwerpunkt des auf die Gitterstruktur (I) auftreffenden Anregungslichtflecks zur Einkopplung in die in Beispiel 1b genannte Sensorplattform erlaubt. Unmittelbar nach dem als Anregungslichtquelle benutzten Laser befindet sich im Lichtweg ein Shutter, um den Lichtweg zu blockieren, wenn keine Messdaten aufgenommen werden sollen. Zusätzlich können Neutralfilter oder Polarisatoren an dieser Stelle oder auch anderen Positionen im weiteren Weg des Anregungslichts zur Sensorplattform in den Lichtweg gestellt werden, um die Anregungsintensität stufenweise oder kontinuierlich zu variieren.

Der Anregungslichtstrahl eines Helium-Neon-Lasers bei 632.8 nm wird mit einer 25-fachen Aufweitungsoptik auf ein paralleles Strahlenbündel mit kreisförmigem Querschnitt von 25 mm Durchmesser aufgeweitet. Hiervon wird eine quadratische Fläche von 10 mm Länge x 10 mm Breite (entsprechend den Bezeichnungen für die Gitterstrukturen) aus dem zentralen Teil des Anregungslichtbündels ausgewählt und über einen dichroischen Spiegel (650 DRLP, Omega Optical, Brattleborough, VT, USA) durch die optisch transparente Schicht (a) hindurch auf eines der 96 Array im Zentrum des Anregungslichtbündels geleitet. Die Sensorplattform wird auf maximale Einkopplung justiert, welche an einem der Minimum der Transmission von Anregungslicht durch die Sensorplattform und einem Maximum der Summe aus reflektiertem Anregungslicht und innerhalb der Messgenauigkeiten unter gleichem Winkel wie dem der Reflexion nach Einkopplung in die Sensorplattform über die durchgehende Gitterstruktur (c) wieder ausgekoppeltem Anregungslicht erkennbar ist. Der optimale Einkopplungswinkel kann sowohl durch visuelle Kontrolle als auch computergesteuert über die Signale von in den entsprechenden Strahlengängen positionierten Photodioden mit anschliessendem Verstärker bestimmt werden. Auf diese Weise wird als Resonanzwinkel für die Einkopplung ein Winkel von  $+3.5^\circ$  bestimmt.

#### ***ii) Detektion***

Als ortsauflösender Detektor dient eine CCD-Kamera (TE3/A Astrocams, Cambridge, UK) mit Peltier-Kühlung (Betriebstemperatur  $-30^\circ\text{C}$ ). Die Signalerfassung und Fokussierung auf den CCD-Chip erfolgt mit einem Heligon-Tandem-Objektiv (Rodenstock, zweimal Cine-Heligon 2.1/100 mm). Zwischen den beiden Hälften des Heligon-Tandem-Objektivs befinden sich, auf einem Filterwechsler montiert, 2 Interferenzfilter

(Omega, Brattleborough, Vermont, USA) mit Zentralwellenlänge von 680 nm und 40 nm Bandbreite, sowie entweder ein Neutralfilter (zur Transmission des abgeschwächten, gestreuten Anregungs- und sehr viel schwächeren Lumineszenzlichts von den Messbereichen) oder ein Neutralfilter in Kombination mit einem Interferenzfilter (zur Transmission des abgeschwächten, von den Messbereichen gestreuten Anregungslichts). Die Signale bei der Anregungs- und der Lumineszenzwellenlänge werden alternierend gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgt durch kommerziell erhältliche Bildverarbeitungssoftware (ImagePro Plus)

**e) Verfahren zum Lumineszenznachweis der Hybridisierungsreaktion:**

In jedes der 96 Probenbehältnisse der oben beschriebenen Vorrichtung mit immobilisierten cDNA Arrays werden 30 µl der wie unter dem Abschnitt "Probematerial" vorbereiteten flüssigen Proben manuell oder über einen Laborroboter (z.B. Beckman 2000) eingefüllt. Die 96 Well Platte wird anschliessend mit einem Deckel hermetisch abgeschlossen, so daß über jedem Well ein Dampfraum von maximal 100 µl entsteht.

In einem ersten thermischen Schritt (Temperaturerhöhung auf 85 °C für 30 Minuten) werden die auf der Oberfläche immobilisierten doppelsträngigen cDNAs dehybridisiert (vereinzelt) und so zur Hybridisierung mit den in der Probe vorhandenen Cy5 markierten einzelsträngigen cDNAs vorbereitet. Durch langsames Abkühlen auf 43 °C (etwa 2 °C pro Minute) und 8 Stunden Temperieren auf 43 °C wird eine Hybridisierung von immobilisierten einzelsträngigen cDNA mit den komplementären Cy5 markierten Molekülen unter sog. stringenten Bedingungen (Hybridisierung nur völlig komplementärer Einzelstränge) ermöglicht. Durch Austausch der verbliebenen Probeflüssigkeit und Absenken auf Raumtemperatur kann dieser Zustand stabilisiert werden.

Zum Auslesen der Arrays in den einzelnen Probenbehältnissen wird die vorgehend beschriebene Vorrichtung in dem beschriebenen analytischen System eingesetzt und auf maximale Einkopplung des Anregungslichts im Array des ersten der 96 Probenbehältnisse entsprechend der obigen Beschreibung justiert, was mit Position des Filterwechslers für die Anregungswellenlänge kontrolliert wird. Anschliessend wird die Intensität des Fluoreszenzlichts aus den Messbereichen (Spots) des Arrays mit Position des Filterwechslers für die Lumineszenzwellenlänge gemessen. Das Auslesen der Arrays in den weiteren Probenbehältnissen erfolgt

**3 3**

sequentiell (für jeweils ein Probenbehältnis mit einem Array von 400 diskreten Messbereichen nach dem anderen), mittels Translation der Vorrichtung zur nächsten Position für das Auslesen der Lumineszenzsignale aus dem nächsten Probenbehältnis.

**Beispiel 2: Bestimmung der Art und des Ausmasses von Enzyminduktion in Toxikologie und Drug Metabolismus mittels eines schnellen und hochparallelen auf Mikroarrays basierenden Differenzverfahrens**

In der pharmazeutischen Produktentwicklung werden nach Applikation von Xenobiotika (biologisch und / oder pharmakologisch wirksamen chemischen Substanzen) in Versuchstieren und im Menschen Untersuchungen des Wirkstoffmetabolismus und Toxikologiestudien durchgeführt. Dabei werden u. a. im „First Path Metabolismus“ die ersten metabolischen Abbaureaktionen in der Leber untersucht. Häufig wird nach der Verabreichung solcher Substanzen eine „Enzyminduktion“, d. h. eine Beeinflussung der Konzentration der im Metabolismus in der Leber beteiligten Enzyme, typischerweise aus der Gruppe der P450 Isoenzyme (gemischt funktionelle Monooxygenasen), beobachtet. Diese Änderung wiederum beeinflusst die Qualität und die Geschwindigkeit der weiteren Metabolisierung solcher Substanzen. Es besteht die Notwendigkeit, beim Test neuer pharmakologisch aktiver Substanzen diese Beeinflussung sehr früh im Testverfahren auf der Ebene der mRNA quantitativ und mit hoher Empfindlichkeit im Vergleich zum Metabolismus von unbehandelten (nicht induzierten) Organismen zu messen.

**Herstellung und Aufbringung der biologischen Erkennungselemente auf einer Sensorplattform einer Vorrichtung mit je 100 diskreten Messbereichen in 96 Probenbehältnissen**

a) Klone der 20 wichtigsten in der Literatur beschriebenen Cytochrom P450 Isoenzyme, die eine Rolle im „First Path Metabolismus“ in der Leber eine Rolle spielen, sowie 5 Klone

von Genen, die typischerweise keine Rolle in diesen Prozessen spielen, deren Expressionsniveau im Idealfall konstant bleibt und deshalb zur Standisierung herangezogen werden können (sogenannte "Housekeeping Genes", u.a.  $\beta$ -Actin und GAPDH, Tubulin- $\alpha$ , Ubiquitin, Phospholipase A2, etc.), werden ausgewählt als biologische Erkennungselemente, welche auf der Sensorplattform in diskreten Messbereichen immobilisiert werden sollen.

Zu der ersten Gruppe ausgewählter biologischer Markersubstanzen gehören unter anderem CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1, CYP2B2, CYP3A1, CYP3A2, CYP4A1.

Das erforderliche genetische Material kann in Plasmidform kommerziell bezogen werden. Die Überführung und Amplifikation der Gensequenzen im Plasmid zu den entsprechenden cDNAs erfolgt mittels der entsprechenden Primerpaare und erzeugt doppelsträngige Moleküle (Probe cDNAs) mit einer Länge zwischen etwa 300 und 1000 Basenpaaren.

b) Es wird eine Sensorplattform mit den äusseren Abmessungen 76 mm Breite x 112 mm Länge x 0.7 mm Dicke verwendet, auf deren Fläche durch Kombination mit einer Platte aus Polymethylmethacrylat mit in Richtung der Sensorplattform offenen Ausnehmungen mit den Innendimensionen 7 mm Breite x 7 mm Länge x 0.15 mm Höhe 96 Mikrofluszellen im Raster einer klassischen Mikrotiterplatte erzeugt werden können. Mittels Dichtungsringen, welche die Ausnehmungen umschliessen, sind die Ausnehmungen gegeneinander dicht verschliessend abgedichtet.

Das Substratmaterial (optisch transparente Schicht (b) besteht aus AF 45 Glas (Brechungsindex  $n = 1.52$  bei 633 nm). Im Substrat wird mittels holographischer Belichtung der mit aufgeschleudertem Photolack bedeckten Schicht (b) und anschliessendes nasschemisches Ätzen ein Raster von Paaren aus Ein- und Auskoppelgittern mit parallel zur Breite der Sensorplattform verlaufenden Gitterlinien (360 nm Periode) von  $12 \pm 3$  nm Gittertiefe erzeugt, wobei die Gitterlinien über die gesamte Breite der Sensorplattform ausgeprägt sind. Der Abstand zwischen aufeinanderfolgenden Gitterpaaren beträgt 9 mm, die Länge der einzelnen Gitterstrukturen (parallel zur Länge der Sensorplattform) 0.5 mm. Der Abstand zwischen dem Ein- und Auskoppelgitter eines Gitterpaares beträgt

5.5 mm, so dass die Ein- und Auskopplung des Anregungslichts jeweils innerhalb des Bereichs der Probenbehältnisse, nach Kombination der Sensorplattform mit der oben beschriebenen Polymethylmethacrylatplatte, erfolgen kann.

Die wellenleitende, optisch transparente Schicht (a) aus  $Ta_2O_5$  auf der optisch transparenten Schicht (b) wird durch reaktives, magnetfeldunterstütztes DC-Sputtern (siehe DE-A- 44 10258) erzeugt und hat einen Brechungsindex von 2.15 bei 633 nm (Schichtdicke 150 nm). Die Gitterstruktur überträgt sich infolge des Abscheidungsprozesses nahezu maßstäblich im Verhältnis 1:1 auf die Oberfläche der wellenleitenden Schicht, in die sich die Gitterstruktur überträgt.

Die von der Sensorplattform und der damit kombinierten Polymethylmethacrylatplatte gebildeten Probenbehältnisse weisen auf den der Sensorplattform gegenüberliegenden Begrenzungsflächen konisch ausgebohrte Öffnungen auf, so dass eine Befüllung oder Entleerung der Probenbehältnisse durch Einpressen von standardisierten, kommerziell erhältlichen Pipettenspitzen aus Polypropylen erfolgen kann.

Zur Vorbereitung auf die Immobilisierung der biochemischen oder biologischen oder synthetischen Erkennungselemente wird die Sensorplattformen mit Chloroform im Ultraschallgerät gereinigt und mittels einer Silanisierungsreaktion mit Glycidylxypropyltrimethoxysilan chemisch aktiviert und so zur Immobilisierung der Probe cDNA's als biologische Erkennungselemente vorbereitet. Die einzelnen cDNAs in einer Konzentration von 50 ng/ $\mu$ l werden mittels einer kommerziellen piezogesteuerten Mikropipette (GeSim GmbH, Großkrummannsdorf, DE) mit jeweils 10 Tropfen zu 0.1 nl auf einen Punkt aufgebracht, was zu Spotdurchmessern als diskreten Messbereichen von ca. 150  $\mu$ m führt. In einer 10 x 10 Spot-Anordnung (100 Feature Array werden jeweils 4 Messbereiche mit gleicher cDNA erzeugt, so dass am Ende des Immobilisierungsvorganges die durch einen statistischen Algorithmus festgelegte Position der 25 verschiedenen als Erkennungselementen dienenden cDNAs bekannt, jedoch rein statistisch vorgegeben ist. Die Spots weisen einen Abstand der Spotmittelpunkte von 400  $\mu$ m auf und belegen so eine Fläche von 4 x 4 mm auf der Sensorplattform. Durch thermische Behandlung – Aufheizen auf 60 °C für 30 min. – kann die Immobilisierung optimiert werden.

## 36

Auf die so vorbereitete Sensorplattform wird die beschriebene Polymethylmethacrylatplatte so aufgebracht, dass die einzelnen Probenbehältnisse gegeneinander über die umgebenden Dichtungen fluidisch dicht verschliessend gegeneinander abgeschlossen und die Arrays aus jeweils 100 von den Spots gebildeten Messbereichen zentrisch am Boden der Probenbehältnisse angeordnet sind.

**c) Probenmaterial:*****i) mRNA aus nicht induzierten (nicht mit Xenobiotika behandelten) Versuchstieren***

Etwa 250 mg Leber aus getöteten Mäusen wird mit flüssigem Stickstoff schockgefroren, im Mörser zerkleinert und mit Chloroform entfettet. Anschließend wird "Total RNA" über eine Standard Phenol / Chloroform-Extraktion isoliert. Mittels einer Oligotex Spin Column (Qiagen) wird mRNA aus der Total RNA Fraktion isoliert. Mittels eines Reversed Transkriptase Verfahrens (z.B. Life Technologies) unter Anwesenheit einer Cy5 (Pharmacia Amersham) markierten Nukleobase (Cy5-dUTP) werden sämtliche mRNA-Arten in fluoreszenzmarkierte cDNA Moleküle übergeführt. Das so erhaltene Material wird in Hybridisierungspuffer aufgenommen, so daß eine Gesamtkonzentration von maximal 10 ng/µl als flüssige Probe vorliegt.

***ii) mRNA aus induzierten (mit Xenobiotika behandelten – als Testinduktor eignet sich zum Beispiel Phenobarbital) Versuchstieren***

Die Ausführung erfolgt in analoger Weise wie vorgehend unter Beispiel 2.c.i) beschrieben, mit dem einzigen Unterschied, dass die Fluoreszenzmarkierung mit Cy3 (Pharmacia Amersham) anstelle von Cy5 erfolgt.

***iii)*** Markierte mRNA aus den Ansätzen i) und ii) wird im Verhältnis 1:1 gemischt.

**d) Analytisches System*****Optisches System******i) Anregungseinheit***

Die Sensorplattform ist auf einer computergesteuerten Justiereinheit montiert, welche die Translation parallel und senkrecht zu den Gitterlinien sowie eine Rotation Drehachse parallel zu den Gitterlinien und durch den Schwerpunkt des auf die Gitterstruktur (I) auftreffenden Anregungslichtflecks zur Einkopplung in die in Beispiel 2b) genannte Sensorplattform erlaubt. Unmittelbar nach dem als Anregungslichtquelle benutzten Laser befindet sich im Lichtweg ein Shutter, um den Lichtweg zu blockieren, wenn keine Messdaten aufgenommen werden sollen. Zusätzlich können Neutralfilter oder Polarisatoren an dieser Stelle oder auch anderen Positionen im weiteren Weg des Anregungslichts zur Sensorplattform in den Lichtweg gestellt werden, um die Anregungsintensität stufenweise oder kontinuierlich zu variieren.

Der Anregungslichtstrahl eines Helium-Neon-Lasers (2 mW) wird mit einer Linsenkombination, unter Verwendung einer Zylinderlinse, zu einem spaltförmigem Lichtstrahl (parallel zu den Gitterlinien der Sensorplattform) aufgeweitet. Die oberen und unteren Randgebiete des parallel zu den Gitterlinien leicht divergenten, in der dazu senkrechten Projektion jedoch parallelen Anregungslichts werden durch einen Spalt ausgeblendet. Das resultierende Lichtbündel mit spaltförmigem Querschnitt auf der Gitterstruktur wird auf die rechte Kante des Einkoppelgitters in einem der Probenbehälter geleitet. Der Anregungslichtfleck hat eine Grösse von ca. 0.8 mm Länge x 4 mm Breite. Die Sensorplattform wird auf maximale Einkopplung justiert, was an maximaler Intensität des Streulichts erkennbar ist, welches längs des eingekoppelten Modes geführten Anregungslichts durch Streuung abgestrahlt wird. Dieses Maximum kann man sowohl durch visuelle Bestimmung als auch durch Abbildung des mit dem Abbildungssystem erfassten Streulichts längs des Anregungsmodes auf einen optoelektronischen Detektor, z. B. auf die Pixels einer CCD-Kamera als Beispiel eines ortsauflösenden Detektors oder einer Photodiode als Beispiel eines nicht ortsauflösenden Detektors, bestimmen. Unter denselben Einkoppelbedingungen misst man für das am Auskoppelgitter ausgekoppelte im Wellenleiter transmittierte Anregungslicht ebenfalls ein Maximalsignal. Als Resonanzwinkel für die Einkopplung wird ein Winkel von  $+3.8^\circ$  bestimmt.

Als zweite Anregungslichtquelle wird ein grüner Helium-Neon-Laser mit Emission bei 543 nm verwendet. Über einen Spiegel, der sowohl manuell als auch motorgetrieben zwischen festen Positionen klappbar ist, kann der Anregungsstrahl in denselben Strahlengang wie der vorgehend beschriebene rote Helium-Neon-Laser-Strahl (633 nm) geleitet werden, wobei dann zugleich der Strahlengang des roten Lasers blockiert wird. Die Einstellung des Resonanzwinkels für die Einkopplung folgt in gleicher Weise wie oben beschrieben, wobei ein Wert von  $+15^\circ$  bestimmt wird.

### ***ii) Detektion***

Als ortsauflösender Detektor dient eine CCD-Kamera (TE3/A Astrom, Cambridge, UK) mit Peltier-Kühlung (Betriebstemperatur  $-30^\circ\text{C}$ ). Die Signalerfassung und Fokussierung auf den CCD-Chip erfolgt mit einem Heligon-Tandem-Objektiv (Rodenstock, zweimal Cine-Heligon 2.1/100 mm). Zwischen den beiden Hälften des Heligon-Tandem-Objektivs befinden sich, auf einem Filterwechsler montiert, 2 Interferenzfilter (Omega, Brattleborough, Vermont) mit Zentralwellenlänge von 680 nm und 40 nm Bandbreite, sowie entweder ein Neutralfilter (zur Transmission des abgeschwächten, gestreuten Anregungs- und sehr viel schwächeren Lumineszenzlichts von den Messbereichen) oder ein Neutralfilter in Kombination mit einem Interferenzfilter (zur Transmission des abgeschwächten, von den Messbereichen gestreuten Anregungslichts). Die Signale bei der Anregungs- und der Lumineszenzwellenlänge werden alternierend gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgt durch kommerziell erhältliche Bildverarbeitungssoftware (ImagePro Plus)

### **e) Verfahren zum Lumineszenznachweis der Hybridisierungsreaktion:**

Jede der 96 Mikroflussszellen wird individuell mit Hilfe des Laborroboters mit nach dem oben aufgeführten Verfahren behandeltem biologischen Material gefüllt. In einem ersten thermischen Schritt (Temperaturerhöhung auf  $85^\circ\text{C}$  für 30 Minuten) werden die auf der Oberfläche immobilisierten doppelsträngigen cDNAs dehybridisiert (vereinzelte) und so zur Hybridisierung mit den in der Probe vorhandenen Cy5 respektive Cy3 markierten einzelsträngigen cDNAs vorbereitet. Durch langsames Abkühlen auf  $43^\circ\text{C}$  (etwa  $2^\circ\text{C}$  pro Minute) und 8 Stunden Temperieren auf  $43^\circ\text{C}$  wird eine Hybridisierung von immobilisierten einzelsträngigen cDNA mit



den komplementären Cy5 bzw Cy3 markierten Molekülen unter sogenannten stringenten Bedingungen (Hybridisierung nur völlig komplementärer Einzelstränge), jedoch ohne kinetische oder thermodynamische Bevorzugung der verschiedenen markierten Moleküle, ermöglicht. In einem weiteren Schritt wird mit Hilfe des Laborroboters die überstehende Flüssigkeit durch reinen Hybridisierungspuffer ersetzt, um nicht gebundenes, zur Fluoreszenz anregbares Material sowie unspezifisch an der Oberfläche gebundenes Material zu entfernen.

Nach der Lumineszenzmessung kann zur Regenerierung mit Hilfe des Laborroboters 2-molare Harnstofflösung als chaotropes Reagenz zugeführt werden. Eine Erhöhung der Temperatur auf bis zu 80 °C vervollständigt diesen Prozess. Nach weiterem Spülen mit 10 mM Phosphatpuffer und Reäquilibrieren mit reinem Hybridisierungspuffer kann das Fluidik / Arraysystem wiederbenutzt werden.

Zum Auslesen der Arrays in den einzelnen Probenbehältnissen wird die vorgehend beschriebene Vorrichtung in dem beschriebenen analytischen System eingesetzt und auf maximale Einkopplung des Anregungslichts (zunächst für 633 nm) im Array des ersten der 96 Probenbehältnisse entsprechend der obigen Beschreibung justiert, was mit Position des Filterwechslers für die Anregungswellenlänge kontrolliert wird.

Anschliessend wird die Intensität des Fluoreszenzlichts aus den Messbereichen (Spots) des Arrays mit Position des Filterwechslers für die Lumineszenzwellenlänge (zunächst mit Filter 680 DF 40, Omega Brattleborough, VT, für Cy5) gemessen. Das Auslesen der Arrays in den weiteren Probenbehältnissen erfolgt sequentiell (für jeweils ein Probenbehältnis mit einem Array von 100 diskreten Messbereichen nach dem anderen), mittels Translation der Vorrichtung zur nächsten Position für das Auslesen der Lumineszenzsignale aus dem nächsten Probenbehältnis.

Anschliessend wird die Vorrichtung auf die Einkoppleposition für das Array im ersten Probenbehältnis zurückgefahren und nach Umklappen des Spiegels auf maximale Einkopplung für das grüne Anregungslicht (543 nm) eingestellt. Anschliessend wird die Intensität des Fluoreszenzlichts aus den Messbereichen (Spots) des Arrays mit Position des Filterwechslers für die kürzerwellige Lumineszenzwellenlänge (mit Filter 580 DF 40, Omega Brattleborough, VT, USA, für Cy3) gemessen. Das Auslesen der Arrays in den weiteren Probenbehältnissen erfolgt sequentiell (für jeweils ein Probenbehältnis mit einem Array von 100 diskreten Messbereichen nach

dem anderen), mittels Translation der Vorrichtung zur nächsten Position für das Auslesen der Lumineszenzsignale aus dem nächsten Probenbehältnis.

**Beispiel 3: Vorrichtung und Verfahren zur gleichzeitigen quantitativen Bestimmung mehrerer Zytokin-Markerproteine in einer und mehrerer Analysenproben (Multi-Zytokin Platte)**

a) Als Vorrichtung dient eine quadratische Sensorplattform mit den äusseren Abmessungen 101.6 mm x 101.6 mm (4 Zoll x 4 Zoll) x 0.7 mm Dicke, verbunden mit einer 5 mm starken PDMS-Schicht (Polydimethylsilikon, Sylgard 184 Silicon Elastomer Kit von Dow Corning), in der offene, runde Ausparungen von jeweils 7 mm Durchmesser, in einem (Zentrum-zu-Zentrum) Abstand von 9 mm, für die Probenbehältnisse zur Aufnahme von Analysenvolumina (10-100 µl) geformt wurden. Die Ausparungen sind in Form von 11 Reihen und 11 Spalten in der Schicht organisiert (total 121 Wells). Zur Unterdrückung von Streulicht wurde das Polymermaterial mit schwarzem Pigment eingefärbt.

Das Substratmaterial der Sensorplattform (optisch transparente Schicht (b) besteht aus AF 45 Glas (Brechungsindex  $n = 1.52$  bei 633 nm). Im Substrat wird mittels holographischer Belichtung der mit aufgeschleudertem Photolack bedeckten Schicht (b) und anschliessendes nasschemisches Ätzen eine durchgehende Struktur eines Oberflächenreliefgitters einer Periode von 360 nm und einer Tiefe von  $25 \pm 5$  nm erzeugt, mit Orientierung der Gitterlinien parallel zur Kante der Sensorplattform. Die wellenleitende, optisch transparente Schicht (a) aus  $Ta_2O_5$  auf der optisch transparenten Schicht (b) wird durch reaktives, magnetfeldunterstütztes DC-Sputtern (siehe DE 4410258) erzeugt und hat einen Brechungsindex von 2.15 bei 633 nm (Schichtdicke 150 nm). Die Gittertiefen auf der wellenleitenden Schicht, in die sich die Gitterstruktur infolge des Abscheidungsprozesses nahezu masstäblich im Verhältnis 1:1 überträgt.

Die Oberfläche der Sensorplattform wird unter Einwirkung eines Sauerstoffplasmas gereinigt, um organische Kontamination zu entfernen. Anschliessend wird eine Haftvermittlungsschicht, bestehend aus einem Monolayer von Mono-Octadecylphosphat, durch einen Selbstorganisierungsprozess (Self-Assembly) auf die hydrophile

Wellenleiteroberfläche aufgebracht. Diese Oberflächenmodifizierung führt zu einer sehr hydrophoben Oberfläche (Kontaktwinkel  $100^{\circ}$  -  $110^{\circ}$  gegenüber Wasser). Der Prozess der Oberflächenmodifizierung wurde in der Literatur näher beschrieben (D. Brovelli et al., Langmuir 15 (1999) 4324 - 4327).

Auf die hydrophobe Oberfläche der mit der Haftvermittlungsschicht versehenen Sensorplattform werden 121 Arrays (in 11 Reihen x 11 Spalten) von je 25 Spots, ihrerseits in einer Anordnung von jeweils 5 Reihen x 5 Spalten, mit unterschiedlichen Antikörpern als biologischen Erkennungselementen zur Erkennung und Bindung von Zytokin-Markerproteinen mit einem Inkjet Plotter, Modell NP1C (Firma GeSiM mbH, Grosserkmannsdorf, DE) aufgebracht.

b) Die Antikörper werden in einer Konzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  in phosphatgepufferter Salzlösung (pH 7.4) mit einem Anteil von Zucker (0.1% Trehalose) aufgetragen, in flüssigem Zustand für 2-3 Stunden in gesättigter Wasserdampf-atmosphäre inkubiert, anschliessend gewaschen und mit Stickstoff trocken geblasen. Der Durchmesser der Spots, mit einem Abstand (Zentrum-zu-Zentrum) von 1 mm, beträgt im Mittel 0.5 mm. Fünf verschiedene Antikörper zur Erkennung von Zytokinen, im speziellen von unterschiedlichen Interleukinen, werden in den jeweils 5 Reihen eines Einzelarrays verwendet. Um aus jeder Einzelmessung pro zuzuführender Probe zugleich bereits Daten zur statistischen Assayreproduzierbarkeit zu erhalten, werden pro Array jeweils 5 Messbereiche mit gleichen Interleukin-Antikörpern als biologische Erkennungselemente erzeugt. Dabei wird die Position des Messbereichs mit dem jeweiligen Interleukin-Antikörper als biologischem Erkennungselement durch einen statistischen Algorithmus festgelegt, so dass am Ende des Immobilisierungsvorganges die Positionen der 5 verschiedenen Interleukine im 25-Spot Array bekannt, jedoch rein statistisch vorgegeben sind. Damit kann in dem nachfolgenden Nachweisverfahren eine bedeutende Einsparung an Analysenzeit und einzusetzender Probenmenge im Vergleich zu den beschriebenen bekannten Nachweisverfahren (z. B. ELISA) erzielt werden, welche zur Bestimmung der Assayreproduzierbarkeit im allgemeinen eine Vielzahl von Einzelmessungen in diskreten Probenbehältnissen und aufgrund der notwendigen grossen Anzahl von Einzelmessungen auch auf mehreren Mikrotiterplatten voraussetzen.

Die verbleibende, nicht protein-bedeckte hydrophobe Oberfläche wird mit 10 mg/ml Serumalbumin (Inkubationszeit 10 min), zur Unterdrückung von unspezifischer Bindung von Sekundärantikörpern im späteren Nachweisverfahren, geblockt. Nach erfolgter Antikörperauftragung wird die PDMS-Schicht mit der präparierten Sensorplattform derart verbunden, dass sich jeweils ein Array innerhalb der 121 Aussparungen der PDMS-Schicht befindet.

### **c) Analytisches System**

#### ***Optisches System***

##### ***i) Anregungseinheit***

Die Sensorplattform ist auf einer computergesteuerten Justiereinheit montiert, welche die Translation parallel und senkrecht zu den Gitterlinien sowie eine Rotation Drehachse parallel zu den Gitterlinien und durch den Schwerpunkt des auf die Gitterstruktur (I) auftreffenden Anregungslichtflecks zur Einkopplung in die in Beispiel 3a) genannte Sensorplattform erlaubt. Unmittelbar nach dem als Anregungslichtquelle benutzten Laser befindet sich im Lichtweg ein Shutter, um den Lichtweg zu blockieren, wenn keine Messdaten aufgenommen werden sollen. Zusätzlich können Neutralfilter oder Polarisatoren an dieser Stelle oder auch anderen Positionen im weiteren Weg des Anregungslichts zur Sensorplattform in den Lichtweg gestellt werden, um die Anregungsintensität stufenweise oder kontinuierlich zu variieren.

Der Anregungslichtstrahl eines Helium-Neon-Lasers bei 632.8 nm wird mit einer 25-fachen Aufweitungsoptik auf ein paralleles Strahlenbündel mit kreisförmigem Querschnitt von 25 mm Durchmesser aufgeweitet. Hiervon wird eine quadratische Fläche von 16 mm Länge x 16 mm Breite (entsprechend den Bezeichnungen für die Gitterstrukturen) aus dem zentralen Teil des Anregungslichtbündels ausgewählt und über einen dichroischen Spiegel (650 DRLP, Omega Optical, Brattleborough, VT, USA) durch die optisch transparente Schicht (a) hindurch auf eine Gruppe von 4 der 121 Arrays im Zentrum des Anregungslichtbündels geleitet. Die Sensorplattform wird auf maximale Einkopplung justiert, welche an einem Minimum der Transmission von Anregungslicht durch die Sensorplattform und einem Maximum der Summe aus reflektiertem Anregungslicht und innerhalb der Messgenauigkeiten unter gleichem Winkel wie dem der Reflexion nach Einkopplung in die Sensorplattform

## 43

über die durchgehende Gitterstruktur (c) wieder ausgekoppeltem Anregungslicht erkennbar ist. Der optimale Einkopplungswinkel kann sowohl durch visuelle Kontrolle als auch computergesteuert über die Signale von in den entsprechenden Strahlengängen positionierten Photodioden mit anschliessendem Verstärker bestimmt werden. Auf diese Weise wird als Resonanzwinkel für die Einkopplung ein Winkel von  $+3.5^\circ$  bestimmt.

**ii) Detektion**

Als ortsauflösender Detektor dient eine CCD-Kamera (TE3/A Astrocams, Cambridge, UK) mit Peltier-Kühlung (Betriebstemperatur  $-30^\circ\text{C}$ ). Die Signalerfassung und Fokussierung auf den CCD-Chip erfolgt mit einem Heligon-Tandem-Objektiv (Rodenstock, zweimal Cine-Heligon 2.1/100 mm). Zwischen den beiden Hälften des Heligon-Tandem-Objektivs befinden sich, auf einem Filterwechsler montiert, 2 Interferenzfilter (Omega, Brattleborough, Vermont) mit Zentralwellenlänge von 680 nm und 40 nm Bandbreite, sowie entweder ein Neutralfilter (zur Transmission des abgeschwächten, gestreuten Anregungs- und sehr viel schwächeren Lumineszenzlichts von den Messbereichen) oder ein Neutralfilter in Kombination mit einem Interferenzfilter (zur Transmission des abgeschwächten, von den Messbereichen gestreuten Anregungslichts). Die Signale bei der Anregungs- und der Lumineszenzwellenlänge werden alternierend gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgt durch kommerziell erhältliche Bildverarbeitungssoftware (ImagePro Plus)

**d) Nachweisverfahren**

Zur spezifischen Erkennung der nachzuweisenden Zytokine wird das Format eines Sandwich-Assays gewählt. Für die gewählten Zytokine (Interleukine IL#1 bis IL#5) werden jeweils 11 Kalibrationslösungen in phosphatgepufferter Salzlösung mit einem Zusatz von 0.1% Serumalbumin und 0.05% Tween20 hergestellt (Interleukinmengen 0, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300 pg/ml). Zusätzlich werden 11 Misch-Kalibrationslösungen aller 5 Interleukine hergestellt, welche jedes der 5 Interleukine in gleicher Konzentration enthalten, sowie über ein Zufallsverfahren 55 Probelösungen, welche

## 44

unbekannte Konzentrationen der Interleukine enthalten. Dann werden die individuellen Konzentrationslösungen mit dem entsprechenden spezifischen biotinylierten sekundären Interleukin-Antikörper (jeweils 200-picomolar) eine Stunde lang vorinkubiert. Entsprechend werden die Misch-Kalibrationslösungen sowie die Probelösungen mit einer Mischung der 5 verschiedenen sekundären biotinylierten Anti-Interleukin-Antikörper (jeweils 200-picomolar) ebenfalls eine Stunde lang vorinkubiert.

Dann werden je 50 µl der individuellen Kalibrationslösungen in die ersten 5 Reihen von Probenbehältnissen auf der Sensorplattform gefüllt, so dass im nachfolgenden Fluoreszenznachweisschritt mit jeder Reihe eine individuelle Kalibrationskurve (Dose-Response Curve) pro Interleukin erzeugt werden kann. In die sechste Reihe von 11 Probenbehältnissen werden je 50 µl der Misch-Kalibrationslösungen gefüllt, um später entsprechende Kalibrationskurven in Anwesenheit der Analytgemische zu erzeugen. Die 55 Probelösungen werden entsprechend auf die übrigen 5 Reihen von Probenbehältnissen verteilt. Die Inkubationszeit mit allen 121 Messlösungen beträgt 30 Minuten. Nachfolgend werden die Probenbehältnisse mit Puffer (phosphatgepufferte Salzlösung mit einem Zusatz von 0.1% Serumalbumin und 0.05% Tween20) gewaschen. Im abschliessenden Fluoreszenznachweisschritt werden in jedes Probenbehältnis 50 µl von 1-nanomolarem Cy5-Streptavidin (Amersham-Pharmacia) in Pufferlösung (phosphatgepufferte Salzlösung mit einem Zusatz von 0.1% Serumalbumin und 0.05% Tween20) gefüllt und nach weiterer 15-minütiger Inkubationszeit die Fluoreszenzsignale aus jedem der Messbereiche in den 121 Arrays gemessen.

Zum Auslesen der Arrays in den einzelnen Probenbehältnissen wird die vorgehend beschriebene Vorrichtung in dem beschriebenen analytischen System eingesetzt und auf maximale Einkopplung des Anregungslichts in den Arrays der ersten 4 der 121 Probenbehältnisse entsprechend der obigen Beschreibung justiert, was mit Position des Filterwechslers für die Anregungswellenlänge kontrolliert wird. Anschliessend wird die Intensität des Fluoreszenzlichts aus den Messbereichen (Spots) der Arrays mit Position des Filterwechslers für die Lumineszenzwellenlänge gemessen. Das Auslesen der Arrays in den weiteren Probenbehältnissen erfolgt sequentiell (für jeweils eine Gruppe von 4 Probenbehältnissen mit Arrays von jeweils 25 diskreten Messbereichen nach der anderen), mittels

45

Translation der Vorrichtung zur nächsten Position für das Auslesen der Lumineszenzsignale aus dem nächsten Probenbehälter.

### **Patentansprüche**

1. Vorrichtung, umfassend einen planaren optischen Wellenleiter als Bestandteil einer Sensorplattform und eine mit der Sensorplattform direkt oder über ein dichtendes Medium vermittelt in Kontakt stehende, direkt dicht verschliessende oder über das dichtende Medium dicht verschlossene Schicht (g) (gemäss Abbildung 1) mit einer Vielzahl von mindestens zur Seite der Sensorplattform offenen Aussparungen, welche eine Vielzahl von Probenbehältnissen in einer zweidimensionalen Anordnung bilden, dadurch gekennzeichnet, dass in jeweils fünf oder mehr diskreten Messbereichen (d) (gemäss Abbildung 1) in einem einzelnen Probenbehältnis unterschiedliche biochemische oder biologische Erkennungselemente zur spezifischen Erkennung und Bindung unterschiedlicher Analyten immobilisiert sind, wobei die besagten Messbereiche in optischer Wechselwirkung mit dem Anregungslicht aus dem optischen Wellenleiter, als Bestandteil einer Sensorplattform, stehen, welche eine Begrenzungsfläche dieser Probenbehältnisse bildet, wobei den Probenbehältnissen zugeführte Proben- oder Reagensflüssigkeiten abgeführt und nachfolgend weitere Proben- oder Reagensflüssigkeiten, gegebenenfalls ohne Waschschrirte, den gleichen besagten Probenbehältnissen zugeführt werden können.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass von den jeweils fünf oder mehr Messbereichen in einem einzelnen Probenbehältnis jeweils ein oder mehr Messbereiche zur Referenzierung verwendet werden.
3. Vorrichtung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass Messbereiche zur Referenzierung gleicher chemischer oder optischer Parameter in mehreren über die Sensorplattform verteilten Probenbehältnissen verwendet werden, so dass die örtliche Verteilung besagter chemischer oder optischer Parameter auf der Sensorplattform bestimmt werden kann.
4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, dass die besagten Messbereiche in optischer Wechselwirkung mit dem evaneszenten Feld von in dem planaren optischen Wellenleiter geführtem Anregungslicht stehen.



5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 - 4, dadurch gekennzeichnet, dass der optische Wellenleiter als Bestandteil der Sensorplattform ein multimodaler oder monomodaler Wellenleiter aus einem zumindest bei der Anregungs- und der Lumineszenzwellenlänge transparentem anorganischem Material, vorzugsweise Glas, oder organischem Material, vorzugsweise Kunststoff, besonders vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe, die von Polymethylmetacrylat, Polycarbonat, Polystyrol, gebildet wird, ist.
6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 - 5, dadurch gekennzeichnet, dass der optische Wellenleiter als Bestandteil der Sensorplattform selbsttragend ist.
7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 - 4, dadurch gekennzeichnet, dass der optische Wellenleiter als Bestandteil der Sensorplattform ein optischen Schichtwellenleiter mit einer ersten optisch transparenten Schicht (a) (gemäss Abbildung 1) auf einer zweiten optisch transparenten Schicht (b) (gemäss Abbildung 1) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a) ist.
8. Vorrichtung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Material der zweiten optisch transparenten Schicht (b) aus Glas, Quarz oder einem transparenten thermoplastischen Kunststoff, bevorzugt aus der Gruppe, die von Polycarbonat, Polyimid, Polymethylmethacrylat oder Polystyrol gebildet wird, besteht.
9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 - 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Brechungsindex der ersten optisch transparenten Schicht (a) grösser als 1.8 ist.
10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 - 9, dadurch gekennzeichnet, dass die erste optisch transparente Schicht (a) aus  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ ,  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ,  $\text{HfO}_2$ , oder  $\text{ZrO}_2$ , bevorzugt aus  $\text{Ta}_2\text{O}_5$  oder  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  besteht.
11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 - 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Dicke der ersten optisch transparenten Schicht (a) 40 bis 300 nm, bevorzugt 100 bis 200 nm beträgt.
12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 - 11, dadurch gekennzeichnet, dass sich zwischen den optisch transparenten Schichten (a) und (b) und in

## 48

Kontakt mit Schicht (a) eine weitere optisch transparente Schicht (b') (gemäss Abbildung 1) mit niedrigerem Brechungsindex als dem der Schicht (a) und einer Stärke von 5 nm - 10000 nm, vorzugsweise von 10 nm - 1000 nm, befindet.

13. Vorrichtung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Aufgabe der weiteren optisch transparenten Schicht (b') einer Verringerung der Oberflächenrauigkeit unter der Schicht (a) oder der Verminderung des Eindringens des evaneszenten Feldes von in Schicht (a) geführtem Licht in die eine oder mehrere darunter liegende Schichten oder einer Verbesserung der Haftung der Schicht (a) auf der einen oder mehreren darunter liegenden Schichten oder der Verminderung von thermisch hervorgerufenen Spannungen innerhalb der optischen Sensorplattform oder der chemischen Isolation der optisch transparenten Schicht (a) von darunter liegenden Schichten mittels Abdichten von Mikroporen in der Schicht (a) gegen darunter liegende Schichten dient.

14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 - 13, dadurch gekennzeichnet, dass zur Immobilisierung biologischer oder biochemischer oder synthetischer Erkennungselementen auf der optisch transparenten Schicht (a) eine Haftvermittlungsschicht (f) aufgebracht ist.

15. Vorrichtung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Haftvermittlungsschicht (f) (gemäss Abbildung 1) eine Stärke von weniger als 200 nm, vorzugsweise von weniger als 20 nm, hat.

16. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 - 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Haftvermittlungsschicht (f) sich aus chemischen Verbindungen aus den Gruppen Silane, Epoxide, "selbstorganisierte funktionalisierte Monoschichten" zusammensetzt.

17. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 - 16, dadurch gekennzeichnet, dass räumlich getrennte Messbereiche (d) durch räumlich selektive Aufbringung von biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen auf besagter Sensorplattform erzeugt werden.

18. Vorrichtung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass zur Aufbringung der biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen eines oder mehrere Verfahren verwendet werden aus

der Gruppe von Verfahren, die von "Ink jet spotting", mechanischem Spotting mittels Stift oder Feder, micro contact printing, fluidische Kontaktierung der Messbereiche mit den biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen durch deren Zufuhr in parallelen oder gekreuzten Mikrokanälen, unter Einwirkung von Druckunterschieden oder elektrischen oder elektromagnetischen Potentialen" gebildet werden.

19. Vorrichtung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass als besagte biologische oder biochemische oder synthetische Erkennungselemente Komponenten aus der Gruppe aufgebracht werden, die von Nukleinsäuren (DNA, RNA), Antikörpern, Aptameren, membrangebundenen und isolierten Rezeptoren, deren Liganden, Antigene für Antikörper, durch chemische Synthese erzeugte Kavitäten zur Aufnahme molekularer Imprints, "Histidin-Tag-Komponenten" gebildet wird.

20. Vorrichtung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass als biologische oder biochemische oder synthetische Erkennungselementen ganze Zellen oder Zellfragmente aufgebracht werden.

21. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 17 - 20, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen den räumlich getrennten Messbereichen (d) gegenüber dem Analyten "chemisch neutrale" Verbindungen zur Verminderung unspezifischer Bindung oder Adsorption aufgebracht sind.

22. Vorrichtung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass die besagten "chemisch neutralen" Verbindungen aus den Gruppen ausgewählt sind, die zum Beispiel von Albuminen, insbesondere Rinderserum-Albumin, Heringssperma oder auch Polyethylenglycolen gebildet werden.

23. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 - 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Einkopplung des Anregungslichts zu den Messbereichen (d) mithilfe von einer oder mehreren Gitterstrukturen (c) (gemäß Abbildung 1) erfolgt, die in der optisch transparenten Schicht (a) ausgeprägt sind.

24. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 - 23, dadurch gekennzeichnet, dass Auskopplung von in der optisch transparenten Schicht (a) geführtem Licht mithilfe von Gitterstrukturen (c') (gemäß Abbildung 1) erfolgt, die in der optisch transparenten Schicht (a) ausgeprägt sind.

25. Vorrichtung nach Anspruch 23 und Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass in der optisch transparenten Schicht (a) ausgeprägte Gitterstrukturen (c) und (c') gleiche oder unterschiedliche Periode haben und parallel oder nicht parallel zueinander ausgerichtet sind.
26. Vorrichtung nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass die Gitterstrukturen (c) und (c') wechselseitig als Ein- und / oder Auskoppelgitter verwendet werden können.
27. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 - 26, dadurch gekennzeichnet, dass die Gitterstrukturen (c) und gegebenenfalls zusätzlich vorhandene Gitterstrukturen (c') eine Periode von 200 nm – 1000 nm aufweisen und die Modulationstiefe der Gitter 3 bis 100 nm, bevorzugt 10 bis 30 nm beträgt.
28. Vorrichtung nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, dass das Verhältnis von Modulationstiefe zur Dicke der ersten optisch transparenten Schicht (a) gleich oder kleiner als 0,2 ist.
29. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 – 28, dadurch gekennzeichnet, dass die Gitterstruktur (c) ein Reliefgitter mit Rechteck-, Dreieck- oder halbkreisförmigem Profil oder ein Phasen- oder Volumengitter mit einer periodischen Modulation des Brechungsindex in der im wesentlichen planaren optisch transparenten Schicht (a) ist.
30. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 – 29, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen der optisch transparenten Schicht (a) und den immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen eine dünne Metallschicht, vorzugsweise aus Gold oder Silber, gegebenenfalls auf einer zusätzlichen dielektrischen Schicht mit niedrigerem Brechungsindex als der Schicht (a), beispielsweise aus Silica oder Magnesiumfluorid, aufgebracht ist, wobei die Dicke der Metallschicht und der eventuellen weiteren Zwischenschicht so ausgewählt ist, dass ein Oberflächenplasmon bei der Anregungswellenlänge und / oder der Lumineszenzwellenlänge angeregt werden kann.
31. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 - 30, dadurch gekennzeichnet, dass die Gitterstruktur (c) ein diffraktives Gitter mit einer einheitlichen Periode ist.

32. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 - 30, dadurch gekennzeichnet, dass die Gitterstruktur (c) ein multidiffraktives Gitter ist.

33. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 23 - 32, dadurch gekennzeichnet, dass sich die Gitterstrukturen (c) und gegebenenfalls zusätzlich vorhandenen Gitterstrukturen (c') ausserhalb des Bereichs der Probenbehältnisse befinden.

34. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 23 - 32, dadurch gekennzeichnet dass sich Gitterstrukturen (c) und gegebenenfalls zusätzlich vorhandene Gitterstrukturen (c') über den Bereich mehrerer oder alle Probenbehältnisse erstrecken.

35. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 - 33, dadurch gekennzeichnet, dass das Material der mit der Sensorplattform in Kontakt stehenden, dicht verschliessenden Schicht (g) an der Auflageoberfläche zu der Sensorplattform mindestens in der Eindringtiefe des evaneszenten Feldes sowohl für die Anregungsstrahlung als auch für die angeregte Lumineszenzstrahlung transparent ist.

36. Vorrichtung nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, dass die Schicht (g) als zweilagige Schicht vorliegt, deren erste, welche mit der Oberfläche der Sensorplattform in Kontakt gebracht wird, sowohl für die Anregungsstrahlung als auch für die angeregte Lumineszenzstrahlung transparent ist, während die dann anschliessende, sich im weiteren Abstand von der Sensorplattform befindliche Schicht im Spektralbereich der Anregungsstrahlung und der angeregten Lumineszenzstrahlung absorbierend ist.

37. Vorrichtung nach Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, dass das Material der mit der Sensorplattform in Kontakt stehenden, dicht verschliessenden Schicht (g) im Spektralbereich der Anregungsstrahlung und der angeregten Lumineszenzstrahlung absorbierend ist.

38. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 - 37, dadurch gekennzeichnet, dass das Material der mit der Sensorplattform in Kontakt stehenden, dicht verschliessenden Schicht (g) auf der Sensorplattform selbsthaftend ist.

39. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 – 38, dadurch gekennzeichnet, dass das Material der mit der Sensorplattform in Kontakt stehenden, dicht verschliessenden Schicht (g) aus einem Polysiloxan besteht.

40. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 – 39, dadurch gekennzeichnet, dass sich in einem Probenbehältnis 5 - 1000, bevorzugt 10 – 400 Messbereiche befinden.

41. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 – 40, dadurch gekennzeichnet, dass ein einzelner Messbereich in einem Probenbehältnis eine Fläche von  $0.001 - 6 \text{ mm}^2$  einnimmt, wobei die Messbereiche gleiche oder unterschiedliche Grösse haben.

42. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 – 41, dadurch gekennzeichnet, dass die Probenbehältnisse jeweils ein Volumen von 100 nl – 1 ml haben.

43. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 - 42, dadurch gekennzeichnet, dass die Probenbehältnisse auf der von der optisch transparenten Schicht (a) abgewandten Seite, mit Ausnahme von Ein- und / oder Auslassöffnungen für die Zufuhr oder den Auslass der Proben und gegebenenfalls zusätzlicher Reagentien, geschlossen sind und die Zufuhr oder der Auslass von Proben und gegebenenfalls zusätzlicher Reagentien in einem geschlossenen Durchflusssystem erfolgen, wobei im Falle der Flüssigkeitszufuhr zu mehreren Messbereichen oder Segmenten mit gemeinsamen Einlass- und Auslassöffnungen diese bevorzugt spalten- oder zeilenweise adressiert werden.

44. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 - 43, dadurch gekennzeichnet, dass die Zufuhr der Proben und gegebenenfalls zusätzlichen Reagentien in parallelen oder gekreuzten Mikrokanälen, unter Einwirkung von Druckunterschieden oder elektrischen oder elektromagnetischen Potentialen erfolgt.

45. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 - 42, dadurch gekennzeichnet, dass die Probenbehältnisse auf der von der optisch transparenten Schicht (a) abgewandten Seite Öffnungen zur lokal adressierten Zugabe oder Entfernung der Proben oder anderer Reagentien besitzen.

46. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 - 45, dadurch gekennzeichnet, dass Behältnisse für Reagentien vorgesehen sind, welche während des Verfahrens zum Analytnachweis benetzt und mit den Messbereichen in Kontakt gebracht werden.

47. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 – 46, dadurch gekennzeichnet, dass auf der Sensorplattform optisch oder mechanisch erkennbare Markierungen zur Erleichterung der Justierung in einem optischen System und / oder zur Verbindung mit der die Ausnehmungen für die Probenbehältnisse enthaltenden Schicht (g) aufgebracht sind.

48. Analytisches System zur Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen, mit

- mindestens einer Anregungslichtquelle
- einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 – 47
- mindestens einem Detektor zur Erfassung des von dem mindestens einem oder mehreren Messbereichen (d) auf der Sensorplattform ausgehenden Lichts.

49. Analytisches System nach Anspruch 48 mit einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 - 47, dadurch gekennzeichnet, dass das von der mindestens einen Lichtquelle ausgesandte Anregungslicht kohärent ist und unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die optisch transparente Schicht (a) auf die einen oder mehreren Messbereiche eingestrahlt wird.

50. Analytisches System nach Anspruch 49, dadurch gekennzeichnet, dass das Anregungslicht von mindestens einer Lichtquelle mit einer Aufweitungsoptik zu einem im wesentlichen parallelen Strahlenbündel aufgeweitet wird und unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die optisch transparente Schicht (a) auf die einen oder mehreren Messbereiche eingestrahlt wird.

51. Analytisches System nach Anspruch 49, dadurch gekennzeichnet, dass das Anregungslicht von der mindestens einen Lichtquelle durch ein oder, im Falle mehrerer Lichtquellen, gegebenenfalls mehrere diffraktive optische Elemente, vorzugsweise Dammann-Gitter, oder refraktive optische Elemente, vorzugsweise Mikrolinsen-Arrays, in eine Vielzahl von Einzelstrahlen möglichst gleicher Intensität der von einer gemeinsamen Lichtquelle stammenden Teilstrahlen zerlegt wird, welche jeweils im

## 54

wesentlichen parallel zueinander auf räumlich getrennte Messbereiche eingestrahlt werden.

52. Analytisches System nach Anspruch 49, dadurch gekennzeichnet, dass als Anregungslichtquellen zwei oder mehrere kohärente Lichtquellen mit gleicher oder unterschiedlicher Emissionswellenlänge verwendet werden.

53. Analytisches System nach einem der Ansprüche 48 - 52, dadurch gekennzeichnet, dass zur Detektion mindestens ein ortsauflösender Detektor verwendet wird.

54. Analytisches System nach Anspruch 53, dadurch gekennzeichnet dass als der mindestens eine ortsauflösende Detektor mindestens ein Detektor aus der Gruppe verwendet wird, die von CCD-Kameras, CCD-Chips, Photodioden-Arrays, Avalanche-Dioden-Arrays, Multichannelplates und Vielkanal-Photomultiplier gebildet wird.

55. Analytisches System nach einem der Ansprüche 48 - 54, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen der einen oder mehreren Anregungslichtquellen und der Sensorplattform und /oder zwischen besagter Sensorplattform und dem einen oder mehreren Detektoren optische Komponenten aus der Gruppe verwendet werden, die von Linsen oder Linsensystemen zur Formgestaltung der übertragenen Lichtbündel, planaren oder gekrümmten Spiegeln zur Umlenkung und gegebenenfalls zusätzlich zur Formgestaltung von Lichtbündeln, Prismen zur Umlenkung und gegebenenfalls zur spektralen Aufteilung von Lichtbündeln, dichroischen Spiegeln zur spektral selektiven Umlenkung von Teilen von Lichtbündeln, Neutralfiltern zur Regelung der übertragenen Lichtintensität, optischen Filtern oder Monochromatoren zur spektral selektiven Übertragung von Teilen von Lichtbündeln oder polarisationsselektiven Elementen zur Auswahl diskreter Polarisationsrichtungen des Anregungs- oder Lumineszenzlichts gebildet werden.

56. Analytisches System nach einem der Ansprüche 48 - 55, dadurch gekennzeichnet, dass die Einstrahlung des Anregungslichts in Pulsen mit einer Dauer zwischen 1 fsec und 10 Minuten erfolgt.



57. Analytisches System nach einem der Ansprüche 48 - 56, dadurch gekennzeichnet, dass das Emissionslicht aus den Messbereichen zeitlich aufgelöst gemessen wird.

58. Analytisches System nach einem der Ansprüche 48 - 57, dadurch gekennzeichnet, dass zur Referenzierung des verfügbaren Anregungslichts Lichtsignale aus der Gruppe gemessen werden, die von Anregungslicht am Ort der Lichtquellen oder nach ihrer Aufweitung oder nach ihrer Unterteilung in Teilstrahlen, Streulicht bei der Anregungswellenlänge aus dem Bereich der einen oder mehreren räumlich getrennten Messbereiche, und über die Gitterstrukturen (c) oder (c') ausgekoppeltem Licht der Anregungswellenlänge gebildet werden.

59. Analytisches System nach Anspruch 58, dadurch gekennzeichnet, dass die Messbereiche zur Bestimmung des Emissionslichts und des Referenzsignals identisch sind.

60. Analytisches System nach einem der Ansprüche 48 - 59, dadurch gekennzeichnet, dass die Einstrahlung des Anregungslichts auf und Detektion des Emissionslichts von einem oder mehreren Messbereichen sequentiell für einzelne oder mehrere Probenbehältnisse erfolgt.

61. Analytisches System nach Anspruch 60, dadurch gekennzeichnet, dass sequentielle Anregung und Detektion unter Verwendung beweglicher optischer Komponenten erfolgt, die aus der Gruppe von Spiegeln, Umlenkprismen und dichroischen Spiegeln gebildet wird.

62. Analytisches System nach Anspruch 61, dadurch gekennzeichnet, dass sequentielle Anregung und Detektion unter Verwendung eines im wesentlichen winkel- und fokusgetreuen Scanners erfolgt.

63. Analytisches System nach einem der Ansprüche 60 - 62, dadurch gekennzeichnet, dass die Sensorplattform zwischen Schritten der sequentiellen Anregung und Detektion bewegt wird.

64. Verfahren zum Lumineszenznachweis eines oder mehrerer Analyten in einer oder mehreren Proben auf mindestens fünf oder mehr, räumlich getrennten Messbereichen

## 56

mit einer Vorrichtung, umfassend einen planaren optischen Wellenleiter als Bestandteil einer Sensorplattform und eine mit der Sensorplattform direkt oder über ein dichtendes Medium vermittelt in Kontakt stehende, direkt dicht verschliessende oder über das dichtende Medium dicht verschlossene Schicht (g) mit einer Vielzahl von mindestens zur Seite der Sensorplattform offenen Aussparungen, welche eine Vielzahl von Probenbehältnissen in einer zweidimensionalen Anordnung bilden, dadurch gekennzeichnet, dass in jeweils fünf oder mehr diskreten Messbereichen (d) in einem einzelnen Probenbehältnis unterschiedliche biochemische oder biologische Erkennungselemente zur spezifischen Erkennung und Bindung unterschiedlicher Analyten immobilisiert sind, wobei besagte Messbereiche in optischer Wechselwirkung mit dem Anregungslicht aus dem optischen Wellenleiter, als Bestandteil einer Sensorplattform, stehen, welche eine Begrenzungsfläche dieser Probenbehältnisse bildet, wobei den Probenbehältnissen zugeführte Proben- oder Reagensflüssigkeiten abgeführt und nachfolgend weitere Proben- oder Reagensflüssigkeiten den gleichen besagten Probenbehältnissen zugeführt werden können, und weiter dadurch gekennzeichnet, dass Anregungslicht in die Messbereiche geleitet wird, hierbei lumineszenzfähige Stoffe in den Proben oder auf den Messbereichen zur Lumineszenz angeregt und die abgestrahlte Lumineszenz gemessen wird.

65. Verfahren nach Anspruch 64, dadurch gekennzeichnet, dass die besagten Messbereiche in optischer Wechselwirkung mit dem evaneszenten Feld von in dem planaren optischen Wellenleiter geführtem Anregungslicht stehen.

66. Verfahren nach Anspruch 65 mit einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 – 47, dadurch gekennzeichnet, dass (1) die isotrop abgestrahlte Lumineszenz oder (2) in die optisch transparente Schicht (a) eingekoppelte und über die Gitterstruktur (c) ausgekoppelte Lumineszenz oder Lumineszenzen beider Anteile (1) und (2) gleichzeitig gemessen werden.

67. Verfahren nach einem der Ansprüche 64 - 66, dadurch gekennzeichnet, dass zur Erzeugung der Lumineszenz ein Lumineszenzfarbstoff oder lumineszentes Nanopartikel als Lumineszenzlabel verwendet wird, das bei einer Wellenlänge zwischen 300 nm und 1100 nm angeregt werden kann und emittiert.

**57**

68. Verfahren nach Anspruch 67, dadurch gekennzeichnet, dass das Lumineszenzlabel an den Analyten oder in einem kompetitiven Assay an einen Analogen des Analyten oder in einem mehrstufigen Assay an einen der Bindungspartner der immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen oder an die biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen gebunden ist.

69. Verfahren nach einem der Ansprüche 67 - 68, dadurch gekennzeichnet, dass ein zweites oder noch weitere Lumineszenzlabel mit gleicher oder unterschiedlicher Anregungswellenlänge wie das erste Lumineszenzlabel und gleicher oder unterschiedlicher Emissionswellenlänge verwendet werden

70. Verfahren nach Anspruch 69, dadurch gekennzeichnet, dass das zweite oder noch weitere Lumineszenzlabel bei der gleichen Wellenlänge wie der erste Lumineszenzfarbstoff angeregt werden kann, aber bei anderen Wellenlängen emittieren.

71. Verfahren nach Anspruch 69, dadurch gekennzeichnet, dass die Anregungsspektren und Emissionsspektren der eingesetzten Lumineszenzfarbstoffe nur wenig oder gar nicht überlappen.

72. Verfahren nach Anspruch 69, dadurch gekennzeichnet, dass zum Nachweis des Analyten Ladungs- oder optischer Energietransfer von einem als Donor dienenden ersten Lumineszenzfarbstoff zu einem als Akzeptor dienenden zweiten Lumineszenzfarbstoff verwendet wird.

73. Verfahren nach einem der Ansprüche 64 – 72, dadurch gekennzeichnet, dass neben der Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen Änderungen des effektiven Brechungsindex auf den Messbereichen bestimmt werden.

74. Verfahren nach einem der Ansprüche 64 – 73, dadurch gekennzeichnet, dass die einen oder mehreren Lumineszenzen und / oder Bestimmungen von Lichtsignalen bei der Anregungswellenlänge polarisationsselektiv vorgenommen werden.

75. Verfahren nach einem der Ansprüche 64 – 74, dadurch gekennzeichnet, dass die einen oder mehreren Lumineszenzen bei einer anderen Polarisierung als der des Anregungslichts gemessen werden.

76. Verfahren nach einem der Ansprüche 64 – 75 zur gleichzeitigen oder sequentiellen, quantitativen oder qualitativen Bestimmung eines oder mehrerer Analyten aus der Gruppe von Antikörpern oder Antigenen, Rezeptoren oder Liganden, Chelatoren oder "Histidin-tag-Komponenten", Oligonukleotiden, DNA- oder RNA-Strängen, DNA- oder RNA-Analoga, Enzymen, Enzymcofaktoren oder Inhibitoren, Lektinen und Kohlehydraten.

77. Verfahren nach einem der Ansprüche 64 – 76, dadurch gekennzeichnet, dass die zu untersuchenden Proben natürlich vorkommende Körperflüssigkeiten wie Blut, Serum, Plasma, Lymphe oder Urin oder Gewebeflüssigkeiten oder Eigelb sind.

78. Verfahren nach einem der Ansprüche 64 – 76, dadurch gekennzeichnet, dass die zu untersuchende Probe eine optisch trübe Flüssigkeit, Oberflächenwasser, ein Boden- oder Pflanzenextrakt, eine Bio- oder Syntheseprozessbrühe ist.

79. Verfahren nach einem der Ansprüche 64 – 78, dadurch gekennzeichnet, dass die zu untersuchenden Proben aus biologischen Gewebeteilen entnommen sind.

80. Verwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 64 – 79 zu quantitativen oder qualitativen Analysen zur Bestimmung chemischer, biochemischer oder biologischer Analyten in Screeningverfahren in der Pharmaforschung, der Kombinatorischen Chemie, der Klinischen und Präklinischen Entwicklung, zu Echtzeitbindungsstudien und zur Bestimmung kinetischer Parameter im Affinitätscreening und in der Forschung, zu qualitativen und quantitativen Analytbestimmungen, insbesondere für die DNA- und RNA-Analytik und die Bestimmung von genomischen oder proteomischen Unterschieden im Genom, wie beispielsweise Einzelnukleotid-Polymorphismen, zur Messung von Protein-DNA-wechselwirkungen, zur Bestimmung von Steuerungsmechanismen für die m-RNA-Expression und für die Protein(bio)synthese, für die Erstellung von Toxizitätsstudien sowie für die Bestimmung von Expressionsprofilen, insbesondere zur Bestimmung von biologischen und chemischen

Markerstoffen, wie mRNA, Proteinen, Peptiden oder niedermolekularen organischen (Boten-)Stoffen, sowie zum Nachweis von Antikörpern, Antigenen, Pathogenen oder Bakterien in der pharmazeutischen Produktforschung und -entwicklung, der Human- und Veterinärdiagnostik, der Agrochemischen Produktforschung und -entwicklung, der symptomatischen und präsymptomatischen Pflanzendiagnostik, zur Patientenstratifikation in der pharmazeutischen Produktentwicklung und für die therapeutische Medikamentenauswahl, zum Nachweis von Pathogenen, Schadstoffen und Erregern, insbesondere von Salmonellen, Prionen, Viren und Bakterien, insbesondere in der Lebensmittel- und Umweltanalytik.

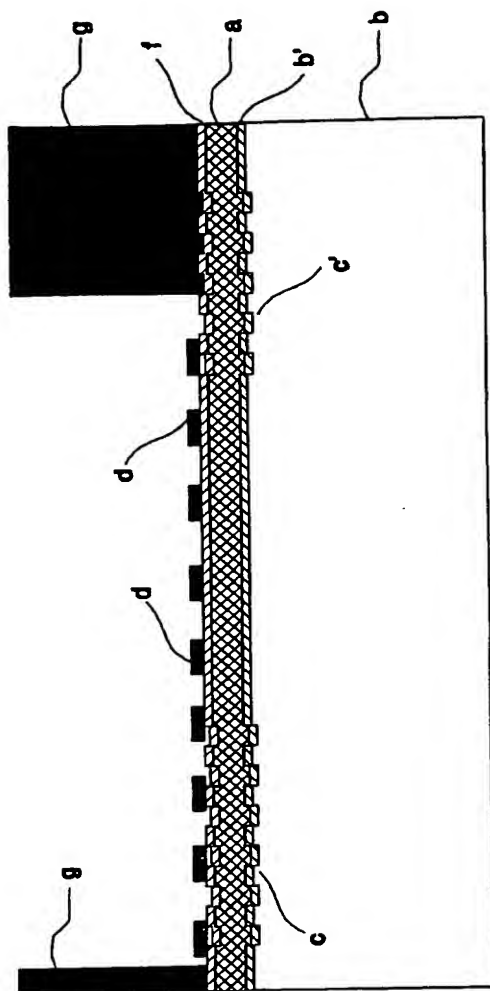


Abbildung 1

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No

PCT/EP 00/07529

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N21/77 G01N21/76 G01N21/64 G01N21/55 G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 35940 A (CIBA GEIGY AG ;BUDACH WOLFGANG (CH); NEUSCHAEFER DIETER (CH); PAWL) 14 November 1996 (1996-11-14) cited in the application	1-19, 23-35, 40, 43-57, 60, 64-71, 76,80
Y	page 2, line 1 - line 3 page 8, line 6 - line 18 page 8, line 28 -page 9, line 3 page 13, line 9 - line 10 page 13, line 13 - line 19 page 14, line 6 - line 16 page 15, line 15 - line 22 -/--	41,42, 58,59, 61-63, 72-75, 77-79

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 December 2000

Date of mailing of the international search report

20/12/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Navas Montero, E

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/07529

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	<p>page 15, line 28 - line 29</p> <p>page 16, line 1 - line 8</p> <p>page 16, line 10 - line 27</p> <p>page 18, line 1 - line 2</p> <p>page 18, line 21 - line 27</p> <p>page 19, line 1 - line 5</p> <p>page 19, line 14 -page 20, line 3</p> <p>page 21, line 10 - line 12</p> <p>page 21, line 19 - line 24</p> <p>page 27, line 19 -page 28, line 2</p> <p>page 26, line 16 - line 22</p> <p>page 28, line 11 - line 17</p> <p>page 29, line 10 - line 17</p> <p>page 34, line 1 - line 12</p> <p>page 38, line 26 -page 39, line 5</p> <p>page 39, line 14 - line 26</p> <p>page 40, line 19 - line 22</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
Y	<p>WO 99 36766 A (STAALBERG RALPH ;SJOELANDER STEFAN (SE); ROOS HAAKAN (SE); BIACORE)</p> <p>22 July 1999 (1999-07-22)</p> <p>page 12, line 14 - line 28</p> <p>page 27, line 1 - line 17</p> <p>page 28, line 24 -page 29, line 4</p> <p>page 33, line 17 - line 18</p> <p>page 39, line 28 - line 30</p> <p>claim 20</p> <p style="text-align: center;">---</p>	41,42
Y	<p>WO 97 35203 A (CHRISTENSEN DOUGLAS A ;UNIV UTAH RES FOUND (US); MILES SCOTT D (US)</p> <p>25 September 1997 (1997-09-25)</p> <p>cited in the application</p> <p>page 9, line 22 -page 10, line 2</p> <p style="text-align: center;">---</p>	58,59,61
Y	<p>US 5 459 325 A (HUETON IAIN ET AL)</p> <p>17 October 1995 (1995-10-17)</p> <p>column 5, line 14 - line 24</p> <p>column 5, line 54 - line 63</p> <p>column 6, line 38 - line 64</p> <p style="text-align: center;">---</p>	62,63
Y	<p>WO 97 46707 A (RASMUSSEN RANDY P ;UNIV UTAH RES FOUND (US); RIRIE KIRK M (US); WI) 11 December 1997 (1997-12-11)</p> <p>page 9, line 30 -page 10, line 25</p> <p style="text-align: center;">---</p>	72
Y	<p>WO 98 09156 A (CIBA GEIGY AG ;KUNZ RINO ERNST (CH); DUEBENDORFER JUERG (CH); KRAU)</p> <p>5 March 1998 (1998-03-05)</p> <p>page 11, line 8 - line 26</p> <p style="text-align: center;">---</p>	73
Y	<p>EP 0 872 735 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH)</p> <p>21 October 1998 (1998-10-21)</p> <p>column 6, line 52 -column 7, line 18</p> <p style="text-align: center;">---</p>	74
	-/--	



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/07529

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 93 25892 A (ARS HOLDING 89 NV ;ATTRIDGE JOHN WORTHINGTON (GB); ROBINSON GRENVIL) 23 December 1993 (1993-12-23) page 9, line 28 - line 37 -----	75
Y	US 5 747 274 A (JACKOWSKI GEORGE) 5 May 1998 (1998-05-05) cited in the application column 9, line 31 - line 50 -----	77-79
X	WO 94 27137 A (UNIV UTAH RES FOUND) 24 November 1994 (1994-11-24) cited in the application page 7, line 27 -page 8, line 19 -----	1

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/07529

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5747274 A		AU 8475791 A	16-04-1992
		BE 1004994 A	16-03-1993
		BR 9104431 A	09-06-1992
		CN 1060533 A, B	22-04-1992
		DE 4122886 A	16-04-1992
		ES 2070658 A	01-06-1995
		FR 2667944 A	17-04-1992
		GB 2248688 A, B	15-04-1992
		IT 1251682 B	19-05-1995
		JP 2628421 B	09-07-1997
		JP 4258765 A	14-09-1992
		KR 167564 B	30-03-1999
		MX 9101550 A	08-07-1992
		NZ 239938 A	25-03-1994
		US 5290678 A	01-03-1994
		US 5744358 A	28-04-1998
		US 5710008 A	20-01-1998
		AU 5117996 A	30-10-1996
		CA 2215018 A	17-10-1996
		EP 0826151 A	04-03-1998
		WO 9632648 A	17-10-1996
		JP 10511185 T	27-10-1998
		NO 974682 A	10-12-1997
		AU 4553993 A	13-02-1995
		WO 9502612 A	26-01-1995
		EP 0710252 A	08-05-1996
		ZA 9404547 A	17-02-1995
WO 9427137 A	24-11-1994	US 5512492 A	30-04-1996
		AU 4341699 A	28-10-1999
		AU 704947 B	06-05-1999
		AU 7311694 A	12-12-1994
		CA 2162996 A	24-11-1994
		EP 0700514 A	13-03-1996
		JP 8510331 T	29-10-1996
		US 5677196 A	14-10-1997
		US 5846842 A	08-12-1998
		US 5919712 A	06-07-1999

# INTERNATIONALE RESEARCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/07529

## A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G01N21/77 G01N21/76 G01N21/64 G01N21/55 G01N33/543

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 96 35940 A (CIBA GEIGY AG ;BUDACH WOLFGANG (CH); NEUSCHAEFER DIETER (CH); PAWL) 14. November 1996 (1996-11-14) in der Anmeldung erwähnt	1-19, 23-35, 40, 43-57, 60, 64-71, 76,80
Y	Seite 2, Zeile 1 - Zeile 3 Seite 8, Zeile 6 - Zeile 18 Seite 8, Zeile 28 -Seite 9, Zeile 3 Seite 13, Zeile 9 - Zeile 10 Seite 13, Zeile 13 - Zeile 19 Seite 14, Zeile 6 - Zeile 16 Seite 15, Zeile 15 - Zeile 22 -/--	41,42, 58,59, 61-63, 72-75, 77-79



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

\*G\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

7. Dezember 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

20/12/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Navas Montero, E

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
	Seite 15, Zeile 28 - Zeile 29 Seite 16, Zeile 1 - Zeile 8 Seite 16, Zeile 10 - Zeile 27 Seite 18, Zeile 1 - Zeile 2 Seite 18, Zeile 21 - Zeile 27 Seite 19, Zeile 1 - Zeile 5 Seite 19, Zeile 14 -Seite 20, Zeile 3 Seite 21, Zeile 10 - Zeile 12 Seite 21, Zeile 19 - Zeile 24 Seite 27, Zeile 19 -Seite 28, Zeile 2 Seite 26, Zeile 16 - Zeile 22 Seite 28, Zeile 11 - Zeile 17 Seite 29, Zeile 10 - Zeile 17 Seite 34, Zeile 1 - Zeile 12 Seite 38, Zeile 26 -Seite 39, Zeile 5 Seite 39, Zeile 14 - Zeile 26 Seite 40, Zeile 19 - Zeile 22 	
Y	WO 99 36766 A (STAALBERG RALPH ;SJOELANDER STEFAN (SE); ROOS HAAKAN (SE); BIACORE) 22. Juli 1999 (1999-07-22) Seite 12, Zeile 14 - Zeile 28 Seite 27, Zeile 1 - Zeile 17 Seite 28, Zeile 24 -Seite 29, Zeile 4 Seite 33, Zeile 17 - Zeile 18 Seite 39, Zeile 28 - Zeile 30 Anspruch 20 	41,42
Y	WO 97 35203 A (CHRISTENSEN DOUGLAS A ;UNIV UTAH RES FOUND (US); MILES SCOTT D (US) 25. September 1997 (1997-09-25) in der Anmeldung erwähnt Seite 9, Zeile 22 -Seite 10, Zeile 2 	58,59,61
Y	US 5 459 325 A (HUETON IAIN ET AL) 17. Oktober 1995 (1995-10-17) Spalte 5, Zeile 14 - Zeile 24 Spalte 5, Zeile 54 - Zeile 63 Spalte 6, Zeile 38 - Zeile 64 	62,63
Y	WO 97 46707 A (RASMUSSEN RANDY P ;UNIV UTAH RES FOUND (US); RIRIE KIRK M (US); WI) 11. Dezember 1997 (1997-12-11) Seite 9, Zeile 30 -Seite 10, Zeile 25 	72
Y	WO 98 09156 A (CIBA GEIGY AG ;KUNZ RINO ERNST (CH); DUEBENDORFER JUERG (CH); KRAU) 5. März 1998 (1998-03-05) Seite 11, Zeile 8 - Zeile 26 	73
Y	EP 0 872 735 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 21. Oktober 1998 (1998-10-21) Spalte 6, Zeile 52 -Spalte 7, Zeile 18 	74
	-/--	

# INTERNATIONAL RECHERCHENBERICHT

Intern. nales Aktenzeichen

PCT/EP 00/07529

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 93 25892 A (ARS HOLDING 89 NV ;ATTRIDGE JOHN WORTHINGTON (GB); ROBINSON GRENVIL) 23. Dezember 1993 (1993-12-23) Seite 9, Zeile 28 - Zeile 37 ---	75
Y	US 5 747 274 A (JACKOWSKI GEORGE) 5. Mai 1998 (1998-05-05) in der Anmeldung erwähnt Spalte 9, Zeile 31 - Zeile 50 ---	77-79
X	WO 94 27137 A (UNIV UTAH RES FOUND) 24. November 1994 (1994-11-24) in der Anmeldung erwähnt Seite 7, Zeile 27 -Seite 8, Zeile 19 -----	1

# INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern. Patentfamilie

PCT/EP 00/07529

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9635940 A	14-11-1996	AU 5763296 A BR 9608503 A CA 2219769 A EP 0824684 A JP 11505610 T PL 323257 A US 6078705 A ZA 9603731 A	29-11-1996 06-07-1999 14-11-1996 25-02-1998 21-05-1999 16-03-1998 20-06-2000 12-11-1996
WO 9936766 A	22-07-1999	EP 1021703 A	26-07-2000
WO 9735203 A	25-09-1997	AU 2583797 A CA 2248190 A EP 0888546 A JP 2000506981 T NO 984356 A	10-10-1997 25-09-1997 07-01-1999 06-06-2000 18-11-1998
US 5459325 A	17-10-1995	EP 0724719 A JP 9503308 T WO 9602824 A	07-08-1996 31-03-1997 01-02-1996
WO 9746707 A	11-12-1997	AU 3154797 A AU 3380097 A AU 3481297 A CA 2256773 A CA 2257109 A EP 0912760 A EP 0906449 A EP 0912766 A EP 1033411 A JP 2000512138 T JP 2000511435 T JP 2000509608 T WO 9746712 A WO 9746714 A	05-01-1998 05-01-1998 05-01-1998 11-12-1997 11-12-1997 06-05-1999 07-04-1999 06-05-1999 06-09-2000 19-09-2000 05-09-2000 02-08-2000 11-12-1997 11-12-1997
WO 9809156 A	05-03-1998	AU 4207897 A EP 0922214 A	19-03-1998 16-06-1999
EP 0872735 A	21-10-1998	DE 19715484 A JP 10307139 A	15-10-1998 17-11-1998
WO 9325892 A	23-12-1993	AT 175498 T AU 670099 B AU 4343493 A CA 2137655 A DE 69322959 D DE 69322959 T DK 645007 T EP 0645007 A ES 2125986 T GR 3029784 T JP 8504268 T US 5994091 A	15-01-1999 04-07-1996 04-01-1994 23-12-1993 18-02-1999 27-05-1999 30-08-1999 29-03-1995 16-03-1999 30-06-1999 07-05-1996 30-11-1999
US 5747274 A	05-05-1998	CA 2027434 A US 5604105 A AU 654672 B	13-04-1992 18-02-1997 17-11-1994

# INTERNATIONAL RESEARCH REPORT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/07529

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5747274 A		AU 8475791 A	16-04-1992
		BE 1004994 A	16-03-1993
		BR 9104431 A	09-06-1992
		CN 1060533 A, B	22-04-1992
		DE 4122886 A	16-04-1992
		ES 2070658 A	01-06-1995
		FR 2667944 A	17-04-1992
		GB 2248688 A, B	15-04-1992
		IT 1251682 B	19-05-1995
		JP 2628421 B	09-07-1997
		JP 4258765 A	14-09-1992
		KR 167564 B	30-03-1999
		MX 9101550 A	08-07-1992
		NZ 239938 A	25-03-1994
		US 5290678 A	01-03-1994
		US 5744358 A	28-04-1998
		US 5710008 A	20-01-1998
		AU 5117996 A	30-10-1996
		CA 2215018 A	17-10-1996
		EP 0826151 A	04-03-1998
		WO 9632648 A	17-10-1996
		JP 10511185 T	27-10-1998
		NO 974682 A	10-12-1997
		AU 4553993 A	13-02-1995
		WO 9502612 A	26-01-1995
		EP 0710252 A	08-05-1996
		ZA 9404547 A	17-02-1995
WO 9427137 A	24-11-1994	US 5512492 A	30-04-1996
		AU 4341699 A	28-10-1999
		AU 704947 B	06-05-1999
		AU 7311694 A	12-12-1994
		CA 2162996 A	24-11-1994
		EP 0700514 A	13-03-1996
		JP 8510331 T	29-10-1996
		US 5677196 A	14-10-1997
		US 5846842 A	08-12-1998
		US 5919712 A	06-07-1999

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ ~~BLURRED~~ OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images  
problems checked, please do not report the  
problems to the IFW Image Problem Mailbox**